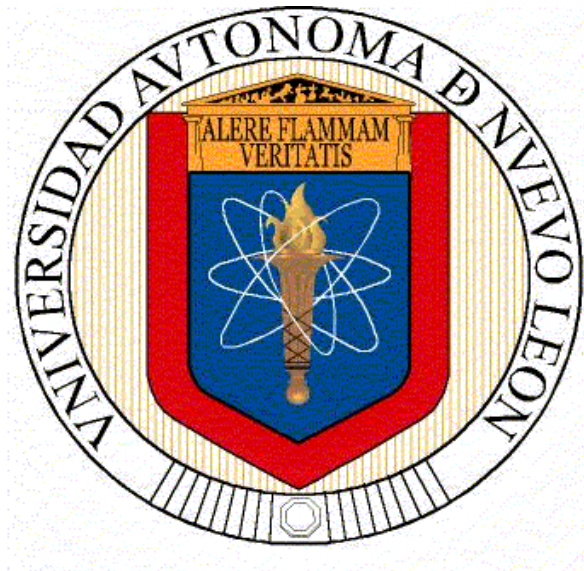


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA PRESENTE EN
EXTRACTOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.), SOBRE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

POR

ANA SOFÍA ORTEGA VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

SEPTIEMBRE 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA PRESENTE EN
EXTRACTOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.), SOBRE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

POR

ANA SOFÍA ORTEGA VILLARREAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

SEPTIEMBRE 2016

Tesis de Posgrado

**Identificación de la actividad inhibitoria presente
en extractos de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.),
sobre la enzima convertidora de angiotensina**

por

L.N. Ana Sofía Ortega Villarreal

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

Director de tesis: Dra. Blanca Edelia González Martínez

Codirector: Dr. Ernesto Torres López

Monterrey, Nuevo León. Septiembre de 2016

Dr. en C.S. Esteban Gilberto Ramos Peña
Subdirector de Investigación, Innovación y Posgrado
Facultad de Salud Pública y Nutrición
Universidad Autónoma de Nuevo León
P R E S E N T E

Por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección y codirección de la tesis titulada: **“Identificación de la actividad inhibitoria presente en extractos de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.), sobre la enzima convertidora de angiotensina”**, presentada por la L.N. Ana Sofía Ortega Villarreal con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 7 de septiembre de 2016.

Dra. Blanca Edelia González Martínez
Director

Dr. Ernesto Torres López
Co-Director

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis APROBÓ la tesis titulada: **“Identificación de la actividad inhibitoria presente en extractos de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.), sobre la enzima convertidora de angiotensina”**, presentada por la L.N. Ana Sofía Ortega Villarreal con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León a 22 de septiembre de 2016.

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez
Presidente

Dra. Blanca Edelia González Martínez
Secretaria

Dr. Ernesto Torres López
Vocal

**“IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA PRESENTE
EN EXTRACTOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.),
SOBRE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA”**

Aprobación de la tesis:

Dra. Blanca Edelia González Martínez

Presidente

Dr. Ernesto Torres López

Secretario

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Vocal

Dr. Esteban Gilberto Ramos Peña

Subdirector de Investigación, Innovación y Posgrado

DEDICATORIA

A mis padres: Hiram y Olga.

Por siempre,
mi profundo respeto y admiración.

A Arturo:

Mi compañero y mi guía,
mi fortaleza y mi incondicional.

*«La única forma de predecir el futuro, es crearlo»
-Abraham Lincoln*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca mensual durante la duración del programa de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por la oportunidad y disponibilidad de las instalaciones y espacios para realizar esta investigación.

A la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) por las facilidades brindadas durante el transcurso del proceso de esta investigación.

A la Dra. Blanca Edelia González Martínez, por su apoyo en todo momento; porque sus enseñanzas *cruzaron fronteras* y porque siempre me alentó y me ha alentado a superarme. Gracias por la confianza que desde el principio me ha tenido.

Al Dr. Ernesto Torres López, porque tener la oportunidad de trabajar con usted ha sido todo un honor para mí. Confió en mí y me ayudó a reforzar la confianza en mí misma. Lo que aprendí con usted se quedará para siempre. Gracias por ser un ejemplo para mí.

Al Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez, por la dicha de recibir sus consejos y observaciones. Gracias por apoyar este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Alimentos por el uso de las instalaciones, reactivos y equipos. A la Biol. Berenice González, porque más que un apoyo fuiste una compañera para mí, gracias por tu amistad. Al LN. Gerardo Arredondo, por compartir este camino y por tu apoyo y empatía en las adversidades que vivimos.

A la Dra. Guadalupe Martínez Cadena, mi infinito y profundo agradecimiento por todo tu apoyo en este proceso. Gracias por ayudarme y escucharme cuando más lo necesitaba.

A mis compañeros de generación: Angélica, Otto, Mariana, Paola, Laura, Chayo y Gerardo, por su amistad y por compartir estos dos años en la maestría.

A toda mi familia, en especial a mis padres Hiram y Olga, por su amor incondicional y su apoyo incomparable. A mis hermanos Hiram Enrique y Amanda Montserrat por su apoyo y compañía.

Al LN. Abad Arturo López Hernández por demostrarme tu apoyo en todo momento; por enseñarme a afrontar la vida con valor y con entereza, por acompañarme en los errores y por alegrarte en mis logros. Tu sello profesional y tu brillante inteligencia siempre me llevaron de la mano y me iluminaron para ver la luz en este camino. Eres por siempre mi ejemplo de lucha y entrega. Gracias por estar siempre a mi lado.

Muchas gracias a todos.

LUGARES DE TRABAJO

La presente tesis fue desarrollada en las siguientes instancias de la Universidad Autónoma de Nuevo León:

- Centro de Investigación de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.

Laboratorio de Alimentos

Laboratorio de Bioquímica Nutricional

Laboratorio de Genética y Biología Molecular

- Servicio de Inmunología de la Facultad de Medicina

Laboratorio de Inmunovirología

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Hipertensión Arterial Sistémica.....	6
2.1.1 Tratamiento y Control de la Hipertensión Arterial	8
2.1.2 Regulación de la Presión Arterial	10
2.1.3 Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA)	14
2.1.4 Compuestos Bioactivos con Capacidad de Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina.....	16
2.2 Compuestos Fenólicos	18
2.2.1 Ácidos Hidroxicinámicos	20
2.2.2 Flavonoides	21
2.2.3 Compuestos Fenólicos y Enfermedad Cardiovascular	24
2.3 Chía (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	26
2.3.1 Compuestos Fenólicos de la Semilla de Chía	28
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos Específicos	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1 Estrategia General de Trabajo.....	32
5.2 Material Biológico	32
5.3 Obtención de extractos de semilla de chía (<i>Salvia hispanica</i> L.)	32
5.4 Cuantificación de los Compuestos Fenólicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	34
5.4.1 Hidrólisis Ácida de Extractos de Semilla de Chía.....	35

5.5 Determinación de la Actividad Inhibitoria sobre la Enzima Convertidora de Angiotensina <i>in vitro</i>	36
5.6 Separación de Compuestos Fenólicos de los Extractos Etanólico y Metanólico de Chía	38
5.7 Selección y Tratamiento de las Fracciones	39
5.8 Identificación de Compuestos Fenólicos en las Fracciones	40
5.9 Determinación de la Actividad Inhibitoria de las Fracciones de los Compuestos Fenólicos.....	40
5.10 Plan de Análisis Estadístico.....	41
VI. RESULTADOS.....	42
6.1 Obtención de Extractos de Semilla de Chía	42
6.2 Estandarización del Método de Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía mediante HPLC	42
6.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía	44
6.3.1 Presencia de Compuestos No Identificados en la Determinación	46
6.4 Estandarización de la Técnica de Análisis de la Actividad Inhibitoria sobre la Enzima Convertidora de Angiotensina.....	47
6.5 Determinación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de extractos de semilla de chía	49
6.6 Separación Cromatográfica de Extractos de Semilla de Chía.....	51
6.7 Selección y Tratamiento de las Fracciones	53
6.8 Identificación de los Compuestos presentes en las Fracciones	53
6.9 Determinación de la Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina de las Fracciones.....	55
VII. DISCUSIÓN	57
7.1 Características de los extractos de semilla de chía	57
7.2 Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía	59

7.3 Actividad Inhibitoria de la ECA de Extractos de Semilla de Chía	62
7.4 Separación Cromatográfica y Semipurificación de Extractos de Semilla de Chía	63
7.5 Identificación de los Compuestos presentes en las Fracciones	65
7.6 Actividad Inhibitoria de la ECA de las Fracciones de Extractos de Semilla de Chía	68
VIII. CONCLUSIONES.....	71
IX. FUENTES DE CONSULTA	72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Estudios de identificación de compuestos fenólicos en semilla de chía	29
2	Porcentaje de rendimiento y extracción de grasa de la muestra	42
3	Tiempo de retención y coeficiente de determinación de los estándares de compuestos fenólicos	43
4	Límites de detección y cuantificación de los estándares de compuestos fenólicos	44
5	Contenido de compuestos fenólicos en extractos de chía (mg/100 g)	45
6	Datos de la estandarización del método de inhibición enzimática	47
7	Actividad inhibitoria de los extractos de semilla de chía	50
8	Valores de IC ₅₀ de los extractos de chía	50
9	Compuestos encontrados en las fracciones de extractos de semilla de chía	54
10	Contenido de luteolina y sus derivados en partes aéreas de distintas especies de Salvia	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Sistema de la regulación de la presión arterial: renina-angiotensina-aldosterona	11
2 Estructura tridimensional de la enzima convertidora de angiotensina	12
3 Isoformas de la ECA: a) ECA somática; b) ECA testicular; c) ECA plasmática	13
4 Estructura química del captopril, fármaco que actúa bloqueando el centro activo de la ECA	15
5 Estructura general de los compuestos fenólicos	19
6 Estructura química del esqueleto de los flavonoides	21
7 Estructura general de los flavonoides más comunes	22
8 <i>Salvia hispanica</i> L.: a) Fotografía de la parte aérea de la planta; b) Semilla de chía; c) Imagen ampliada de la semilla de chía	27
9 Estructura química de los compuestos fenólicos de la semilla de chía	28
10 Estrategia general de trabajo	33
11 Obtención de extractos de semilla de chía	34
12 Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina <i>in vitro</i>	36
13 Separación cromatográfica de extractos de semilla de chía	38
14 Cromatograma de los estándares de compuestos fenólicos evaluados	43
15 Resultados de los cromatogramas de extracto etanólico de chía con la presencia de compuestos no identificados (min 5.4 y 6.2): A: Extracto sin hidrólisis; B: Extracto con hidrólisis.	46

16	Resultados de los cromatogramas de extracto metanólico de chía con la presencia de compuestos no identificados (min 5.0, 5.4 y 6.2): A: Extracto sin hidrólisis; B: Extracto con hidrólisis.	47
17	Cromatograma de los estándares del producto y sustrato del ensayo de inhibición enzimática; HA: Ácido hipúrico; HHL: Hipuril-L-histidil-L-leucina.	48
18	Actividad IECA de captopril	48
19	Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto etanólico de chía	49
20	Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto metanólico de chía	49
21	Calibración de la columna utilizando azul dextrano	51
22	Resultados de la separación cromatográfica del extracto etanólico de semilla de chía	52
23	Resultados de la separación cromatográfica del extracto metanólico de semilla de chía	52
24	Actividad inhibitoria de las fracciones de extractos de semilla de chía a una concentración de 0.03 mg/mL	56
25	Compuestos no identificados en la fracción 5 del extracto metanólico	67

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
ANOVA	Análisis de varianza
AT I	Angiotensina I
AT II	Angiotensina II
C18	18 carbonos
Cl⁻	Ion cloruro
cm	Centímetro
C-terminal	Extremo carbonilo terminal
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
g	Gramo
g/mol	Gramos por mol
HAS	Hipertensión arterial sistémica
HCl	Ácido clorhídrico
HHL	Hipuril-L-Histidil-L-Leucina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IC₅₀	Concentración inhibitoria al 50 %
IECA	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina
IMC	Índice de masa corporal
Kav	Coeficiente de distribución
kg	Kilogramo
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Log	Logaritmo
M	Concentración Molar
m	Metro
mg	miligramo
mg/100 g	Miligramo por cien gramos
mg/dL	Miligramo por decilitro
mg/g	Miligramo por gramo
mg/kg	Miligramo por kilogramo
mg/mL	Miligramo por mililitro

min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercurio
mU	Miliunidad
N	Concentración Normal
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetro
nM	Nanomoles
No.	Número
N-terminal	Extremo amino terminal
Ø	Diámetro
OH	Ion hidroxilo
p-	<i>para-</i>
p/v	Relación peso/volumen
PA	Presión arterial
pH	Potencial de hidrógeno
r²	Coeficiente de determinación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	Fase reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TLC	Cromatografía en capa fina
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
Ve	Volumen de elución
Vo	Volumen de vacío
Vt	Volumen total
Zn²⁺	Ion zinc
α	Alfa
γ	Gamma
δ	Delta
Ω	Ohm
ω-3	Omega 3

RESUMEN

La hipertensión es una patología crónica y un gran problema de salud pública que ha incrementado a nivel mundial; además, está considerado como un importante factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y sus complicaciones. Esta enfermedad representa casi la tercera parte de la población adulta y su prevalencia ha incrementado de manera significativa en los últimos años. En este contexto, existe un creciente interés con el fin de presentar alternativas que mejoren la prevención y el tratamiento de este padecimiento. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la actividad inhibitoria *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólico y metanólico de *Salvia hispanica* L. (chía), en forma cruda y semipurificada, sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Para este trabajo se obtuvieron extractos alcohólicos de la semilla de chia y se cuantificaron los principales compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) antes y después de un tratamiento de hidrólisis ácida (glicósidos y agliconas, respectivamente). Posteriormente, se realizó una cromatografía en columna para fraccionar los extractos utilizando Sephadex LH-20, además se utilizó HPLC para identificar los compuestos fenólicos encontrados. La actividad inhibitoria que ejercieron sobre la ECA, tanto los extractos como las fracciones, fue determinada mediante un ensayo enzimático *in vitro*.

Los resultados demostraron la presencia de los ácidos hidroxicinámicos clorogénico y cafeico, así como los flavonoles miricetina, quercetina y kaempferol en los extractos etanólico y metanólico; la mayoría de ellos se presentó en forma de glicósido en un 50 y 73 %, respectivamente, siendo la miricetina el compuesto encontrado en mayor concentración (tasa 16.5:1 en relación con la quercetina), similar a lo encontrado en estudios previos. Los extractos fueron separados mediante cromatografía en columna y cinco fracciones fueron semipurificadas, las cuales contenían polifenoles, encontrándose en ellas, los cinco compuestos estudiados, así como otros que no pudieron ser identificados mediante la metodología empleada; para elucidar estos compuestos es necesario el empleo de técnicas más complejas y específicas como resonancia magnética nuclear (RMN). Los extractos alcohólicos de semilla de chia y sus respectivas fracciones, demostraron tener actividad inhibitoria de la ECA con un IC_{50} de 7.1 mg/mL para el etanólico y 2.1 mg/mL para el metanólico. Las fracciones 5 de ambos extractos demostraron tener el mejor efecto y la mayor concentración de ácido cafeico. Las fracciones 2, 4 y 5 del extracto metanólico presentaron mayor eficiencia de inhibición de la ECA que los extractos crudos.

Los compuestos fenólicos semipurificados presentes en los extractos de semilla de chia, con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, podrían ser utilizados para el desarrollo de agentes coadyuvantes en el tratamiento antihipertensivo, con la ventaja de ser derivados de una matriz natural, en contraste con los compuestos sintéticos utilizados actualmente.

ABSTRACT

Hypertension is a chronic disease and a major public health problem that is increasing worldwide; moreover, it is considered as a major risk factor for cardiovascular disease and its complications. This disease represents almost a third of the adult population and its prevalence has also increased significantly in recent years. In this context, there is a growing interest in order to present alternatives that improve the prevention and treatment of this disease. Therefore, the aim of this research was to study the *in vitro* angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of phenolic compounds in crude and semi purified form, present in ethanol and methanol *Salvia hispanica* L. (chia) seed extracts.

Alcoholic (ethanol and methanol) chia seed extracts were obtained and the major phenolic compounds were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) before and after acid hydrolysis treatment (glycosides and aglycones, respectively). Subsequently, a column chromatography using Sephadex LH-20 was performed to fractionate extracts, and HPLC was used to identify the phenolics found. The inhibitory activity on ACE was determined by enzyme assay *in vitro* in both extracts and fractions.

Results showed the presence of hydroxycinnamic acids: chlorogenic and caffeic, as well as flavonols: myricetin, quercetin and kaempferol in ethanolic and methanolic extracts; most of them in glycoside form in 50 and 73 %, respectively; being myricetin, the compound found in greater concentration (rate 16.5: 1 in relation with quercetin), similar to previous studies. Extracts were separated in column chromatography and five fractions were semi purified, which contained polyphenols, including the five studied ones, as well as others that could not be identified with the used methods; to elucidate these compounds, more complex and specific techniques are required, such as nuclear magnetic resonance (NMR). Alcoholic extracts of chia seed and their fractions, exhibited inhibitory ACE activity with IC₅₀ values of 7.1 mg/mL for ethanolic and 2.1 mg/mL for methanolic. Fraction 5 of both extracts showed the highest activity and the greatest amount of caffeic acid. Fractions 2, 4 and 5 of methanolic extract exhibited higher efficiency as ACE inhibitors than crude extracts.

The semi purified phenolic compounds detected in extracts of chia seed with inhibitory activity of angiotensin converting enzyme could be used for the development of adjuvant agents for the antihypertensive treatment, with the advantage of being derived from a natural matrix, in contrast to currently used synthetic compounds.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2012 murieron por este motivo 17.5 millones de personas, lo cual representa más del 30 % del registro a nivel mundial según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (2015). La mayoría de estas enfermedades pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo de conducta, como son: el consumo de tabaco, dietas no saludables, inactividad física o el consumo excesivo de alcohol.

Para las personas con estas enfermedades o con alto riesgo cardiovascular (debido a la presencia de uno o más factores de riesgo), son fundamentales la detección y el tratamiento temprano, sin embargo, la situación sanitaria local y la desinformación, no siempre permiten que esto se dé de manera adecuada (Organización Mundial de la Salud, 2015).

En las enfermedades cardiovasculares, uno de los factores de riesgo clave es la hipertensión, la cual es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una presión alta persistentemente ($\geq 140/90$ mmHg) causando daño en el endotelio. La presión arterial (PA) es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias al ser bombeada por el corazón para transportarla a todos los órganos del cuerpo; cuanto más alta es la presión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear. Si no se controla, la hipertensión puede provocar: accidentes cerebrovasculares, infarto al miocardio, insuficiencia cardíaca, deterioro cognitivo, ceguera, entre otros (Osakidetza-Servicio Vasco de Salud, 2015).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) (2012), la prevalencia de hipertensión en los adultos mexicanos es de 31.5 % y es considerada como una de las tasas más altas a nivel mundial. De manera general, solamente la mitad está diagnosticada y de ellos, solamente una fracción de esta cifra, mantiene sus niveles de presión arterial con un control adecuado (Gutiérrez et al., 2012).

Los pacientes que son diagnosticados con esta enfermedad, deben recibir recomendaciones para realizar un cambio en el estilo de vida; adicional a esto, es necesaria una evaluación médica para seleccionar la terapia farmacológica, la cual dependerá de la situación clínica del paciente, eficacia y tolerancia del fármaco, así como comorbilidades asociadas. Dentro de este grupo de medicamentos se encuentran las siguientes categorías: natriuréticos tiazídicos, betabloqueadores, inhibidores de los canales de calcio, antagonistas de los receptores de angiotensina I (AT I) e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), siendo estos últimos de los más seleccionados (Mancia et al., 2013).

A pesar de las ventajas que ejerce este tratamiento (inhibidores de la ECA) en la salud de los pacientes, los fármacos sintéticos producen efectos secundarios, como son tos, alergias y síntomas gastrointestinales; por esta razón, se pretende continuar con la búsqueda de nuevos inhibidores de la ECA que puedan ser seguros y económicos para ser empleados (Simaratanamongkol, Umehara, Noguchi y Panichayupakaranant, 2014; Alashi et al., 2014).

Existen reportes que indican la existencia de algunos alimentos funcionales con actividad antihipertensiva, como son: frutas, hortalizas, vegetales, semillas y raíces (Kwon, Vatter y Shetty, 2006; Guo, Zhang, Wang, Liu y Xin, 2015). La semilla de chía se ha convertido en una fuente alimenticia importante por sus múltiples beneficios para la salud cardiovascular (Ayerza, 2013), entre ellos su capacidad para inhibir la ECA (González, 2012; López y Ortega, 2014) y su efecto vasorelajador en anillos aislados de aorta en ratas (Mota, 2012); en donde se ha atribuido a los compuestos fenólicos como los posibles responsables de esta actividad en distintos estudios realizados con extractos de la semilla (Balasuriya y Rupasinghe, 2012; Nishibori et al., 2012; Silveira y Salas-Mellado, 2014).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Pérez, Duarte, Jiménez, Santos y Osuna, 2009).

Se sabe que una ingesta dietética regular de polifenoles de 1 g/día como máximo, puede ser considerada como inocua y podría asegurar la funcionalidad natural de los alimentos debido a sus compuestos bioactivos, sin las desventajas que se obtienen de los efectos secundarios que producen los fármacos sintéticos (Guerrero et al., 2012).

Además, de manera especial, se justifica la importancia de la prevención y la modificación de hábitos en el estilo de vida, así como la incorporación de compuestos bioactivos que aporten beneficios mediante la dieta, como son los compuestos fenólicos, con el fin de preservar la salud y mejorar la calidad de vida de la población.

Por otra parte, la obtención de un extracto a partir de productos naturales permite concentrar los compuestos y metabolitos secundarios que poseen, los cuales pueden brindar beneficios para el organismo; representando así una forma útil de incluir dichas sustancias en alimentos.

En el campo de la investigación, destaca la importancia en la búsqueda del compuesto responsable de realizar este efecto en el organismo, con el fin de verificar su seguridad para ser utilizada como una alternativa saludable/terapéutica para coadyuvar en el tratamiento de la hipertensión arterial (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, y Yoga, 2011; Schieber, 2012; Mohd et al., 2012).

El aislar compuestos de matrices alimentarias con actividad biológica permite avanzar en la contribución del conocimiento científico en el área de nutrición y alimentación para el establecimiento de opciones saludables y con beneficios para la población.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hipertensión Arterial Sistémica

De acuerdo con la Secretaría de Salud (2014), la Hipertensión Arterial Sistémica (HAS) es un síndrome de etiología multifactorial caracterizado por la elevación persistente de la presión arterial a cifras $\geq 140/90$ mmHg.

La HAS es una condición predisponente a enfermedad coronaria, accidentes vasculares cerebrales, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal y otras comorbilidades. Los elementos más importantes que contribuyen a su evolución son: edad, raza, estilo de vida, factores alimentarios y psicosociales, peso al nacer, uso de algunos fármacos, ingesta de sal y antecedentes genéticos (Kunstmann y Kauffman, 2005; Castaño, Medina, De la Rosa, Loria, 2011).

Los factores de riesgo cardiovascular, que con mayor frecuencia se asocian a HAS y que causan mayores complicaciones, son la dislipidemia, la diabetes mellitus y el tabaquismo. La prevalencia y asociación de estos factores es más frecuente en individuos hipertensos que normotensos y estas aumentan en forma muy significativa el riesgo cardiovascular (Huerta, 2001; Kunstmann y Kauffman, 2005). Además, los datos clínicos indican que el género tiene una influencia importante en la patología y fisiología cardiovascular, afectando en mayor medida a la población masculina (Fernández, Muñoz, Cambillo, Ramos y Alvarado, 2007).

La prevalencia de la HAS se ha mantenido prácticamente sin cambios entre 2006 y 2012 de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Los reportes del 2012 indicaron que el 31.5 % de la población mexicana la padece (33.3 % de los hombres y 30.8 % de las mujeres). El grupo de edad con una prevalencia de hipertensión menor es el de 20 a 29 años de edad, siendo 4.6 veces más baja respecto a los demás grupos; mientras que los grupos entre 70 y 79, así como de 80 años o más, corresponden a la mayor prevalencia (Gutiérrez et al., 2012).

Otro resultado notable de la ENSANUT (2012) reveló que existe un número importante en la prevalencia de HAS de personas que no contaban con el diagnóstico previo de la enfermedad, en todos los grupos de edad; del total de la población que padece hipertensión (31.5 %), la mitad (16.6 %) contaba con un diagnóstico médico previo, mientras que la otra mitad (14.9 %) correspondió a los casos de hallazgo en el momento de la encuesta, según los criterios adoptados por la medición de campo mediante el uso de esfigmomanómetro de mercurio y la clasificación utilizada para categorizar (propuesta del Comité Conjunto Nacional de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Elevada). Es importante destacar, que de los adultos diagnosticados por un médico previamente, solo el 73.6 % reportó estar en tratamiento farmacológico para la atención de la misma y menos de la mitad de esta cifra, mantienen la enfermedad bajo control.

La HAS tiene un curso asintomático en sus primeros estadios, por lo que existe un importante número de pacientes que desconoce su enfermedad; esta situación considera a la hipertensión arterial como una enfermedad silenciosa. La calidad de vida de este grupo de población se ve deteriorada, con la consecuente aparición de comorbilidades, al no ser tratada desde un momento oportuno (Castaño et al., 2011; Gutiérrez et al., 2012).

En el estado de Nuevo León, la situación de HAS se asemeja a los reportes nacionales. De acuerdo con la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición, en el 2012 se encontró una prevalencia del 12.9 % y de 45.5 % en las edades de 20 a 59 años y 60 años y más, respectivamente. Por otra parte, se reportó un 16.9 % y 29.4 % de casos sin diagnóstico previo con la medición al momento de realizar la encuesta en los grupos de edad mencionados previamente. De manera similar, solo el 72.1 % de las personas con hipertensión en el grupo de edad de 20 a 59 años, se encontraba bajo tratamiento farmacológico (Secretaría de Salud de Nuevo León, 2012).

2.1.1 Tratamiento y Control de la Hipertensión Arterial

La Norma Oficial Mexicana para el tratamiento y control de la HAS (Secretaría de Salud, 2012) establece que el plan de manejo del paciente con hipertensión debe incluir el establecimiento de las metas de tratamiento, el tratamiento conductual, el tratamiento farmacológico, la educación del paciente y la vigilancia de complicaciones.

La meta principal del tratamiento es lograr valores de presión arterial <140/90 mmHg; en personas con diabetes o enfermedad cardiovascular establecida, mantener una PA <130/80 mmHg; y en presencia de proteinuria mayor de 1.0 g e insuficiencia renal <125/75 mmHg. Otras metas complementarias para la salud cardiovascular incluyen: mantener un índice de masa corporal (IMC) <25 kg/m²; colesterol sanguíneo <200 mg/dL; evitar o suprimir el tabaquismo y disminuir el consumo excesivo de sodio y alcohol (Secretaría de Salud, 2014).

El manejo conductual consiste en mantener el control de peso, realizar actividad física aeróbica de 30 a 60 minutos al menos tres a cinco días a la semana, limitar el consumo de sal de mesa <5 g al día (2000 mg de sodio), restringir el consumo de alcohol, llevar a cabo una ingesta suficiente de potasio, así como un plan de alimentación que incluya una variedad de: frutas con cáscara y verduras (crudas de preferencia) por su aporte de vitaminas, antioxidantes y minerales; cereales integrales; leguminosas, pescado, lácteos descremados, pollo y carnes magras (Secretaría de Salud, 2012).

El tratamiento farmacológico debe ser prescrito de acuerdo a la Guía de Tratamiento Farmacológico para el Control de la Hipertensión Arterial (Secretaría de Salud, 2014), debe ser individualizado y de acuerdo con el cuadro clínico; debe tomarse en cuenta: el mecanismo de acción del fármaco, las indicaciones y contraindicaciones, los efectos adversos, las interacciones farmacológicas, las enfermedades concomitantes y el costo económico.

El tratamiento de inicio en pacientes con HAS comprende los fármacos de primera línea: diuréticos tiazídicos (ahora natriuréticos), beta-bloqueadores, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina II y antagonistas de calcio de acción prolongada. Los tratamientos de segunda línea constituyen la combinación de dos o más fármacos de primera línea (Secretaría de Salud, 2014).

La terapia debe iniciarse con un solo fármaco utilizando natriuréticos tiazídicos (Secretaría de Salud, 2014) y debe ajustarse a la dosis completa para lograr el objetivo de reducción de la presión arterial. Solo del 20 al 30 % de la población con HAS logra controlar sus niveles de PA con la monoterapia, por lo que la mayoría tiene una prescripción con dos o tres fármacos; su combinación está orientada a las características clínicas y a las comorbilidades del paciente (Castaño et al., 2011).

En conjunto con las directrices anteriormente mencionadas, las nuevas guías del Comité Nacional Unido (JC8 de Estados Unidos de América), resaltan que en la población general, excluyendo la raza negra pero incluyendo pacientes con diabetes, la terapia inicial debe incluir un natriurético –tiazida–, un bloqueador de canales de calcio, un inhibidor de enzima convertidora de angiotensina o un bloqueador de angiotensina; en la población de raza negra, incluyendo diabéticos, la terapia inicial debe incluir un natriurético –tiazida–, o un bloqueador de canales de calcio. En la población mayor de 18 años con enfermedad renal crónica, la terapia inicial debe incluir un inhibidor de enzima convertidora de angiotensina o un bloqueador de angiotensina, con el fin de mejorar la función renal (James et al., 2014).

Si en un mes de tratamiento no se alcanzan las metas del mantenimiento de las cifras de la presión arterial, se debe aumentar la dosis o recurrir a un segundo fármaco de otra clase hasta obtener los resultados deseados. Si no hay éxito después de usar 3 o 4 clases de medicamentos, se debe referir el paciente a un especialista en hipertensión clínica (James et al., 2014).

A pesar de la necesidad de los pacientes con HAS de seguir un tratamiento farmacológico, los medicamentos prescritos para regular la presión arterial pueden causar efectos secundarios, entre los que se encuentran: debilidad, cansancio o somnolencia, pérdida del gusto, boca seca, tos seca y constante, dolor de cabeza, mareos, alergias, síntomas gastrointestinales, entre otros. Debido a que esta terapia debe mantenerse de por vida, esta situación es uno de los factores que contribuyen en mayor medida al abandono del tratamiento farmacológico y el descontrol en las cifras de la PA (Rosendorff et al., 2015).

Por último, la incorporación de un programa de educación y la vigilancia de las complicaciones en la terapia, son estrategias que permiten la modificación de los factores de riesgo y una adherencia al tratamiento farmacológico, además de contribuir en el establecimiento de los cambios necesarios en el estilo de vida de los pacientes con HAS (Secretaría de Salud, 2014).

2.1.2 Regulación de la Presión Arterial

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra las paredes de las arterias para ser bombeadas a todos los órganos; es controlada por una compleja interacción de fuerzas mecánicas, neuroeléctricas y hormonales en el organismo. Es el producto del gasto cardíaco (está determinado por la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción) y la resistencia periférica total (depende de la actividad constrictora o dilatadora de las arteriolas y del eje renina-angiotensina-aldosterona) (Udenigwe y Aluko, 2012).

El gasto cardíaco es controlado por una combinación de factores, entre los que se encuentran: volumen del líquido extracelular, volumen sanguíneo, distensión arterial y venosa y resistencia del flujo sanguíneo. Los riñones tienen un papel importante en el control de volumen del líquido extracelular y la presión arterial (Atlas, 2007).

El principal mecanismo eléctrico de la regulación de la PA es el sistema nervioso central, el cual es parte del sistema nervioso autónomo; conecta al cerebro, corazón, vasos sanguíneos y riñones. Los nervios eferentes del sistema simpático renal participan en la regulación de la PA al transportar señales nerviosas, incrementar la secreción de renina, promover la retención de sodio y reducir el flujo sanguíneo renal. En los pacientes con HAS, los nervios eferentes son hiperestimulados y contribuyen al aumento de PA (Weir y Dzau, 1999; Atlas, 2007).

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Figura 1) es un elemento importante de los mecanismos interrelacionados que regulan la hemodinámica y la homeostasis de agua y electrolitos; produce vasoconstricción, elevación del ritmo cardíaco y retención de agua y sodio. Puede ser desencadenada por señales neuroeléctricas o renales; opera de manera normal en pacientes sanos y se vuelve hiperactivo en pacientes con hipertensión (Manrique, Lastra, Gardner y Sowers, 2009; Te Riet, Van Esch, Roks, Van den Meiracker y Jan Danser, 2015).

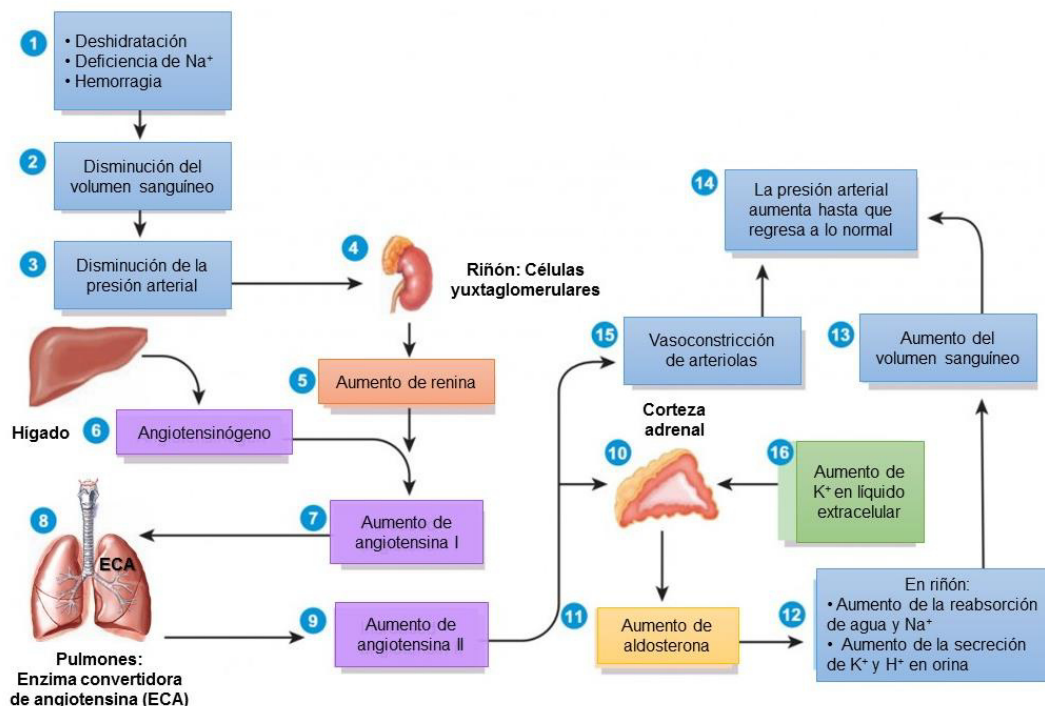


Figura 1. Sistema de la regulación de la presión arterial: renina-angiotensina-aldosterona (Adaptado de Tortora y Derrickson, 2014).

Esta vía inicia con la biosíntesis de renina en el riñón por las células yuxtaglomerulares de la nefrona, su liberación al plasma se produce cuando la región yuxtaglomerular detecta hipotensión arterial o por incremento de la actividad simpática. Ejerce su acción proteolítica sobre el angiotensinógeno (el cual es sintetizado en el hígado) para formar el decapeptido angiotensina I (AT I) (forma biológicamente inactiva) (Manrique et al., 2009).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Figura 2) es una glicoproteína-carboxipeptidasa dependiente de Zn^{2+} anclada a membrana, que requiere la presencia de Cl^- para su actividad catalítica, la cual representa el paso enzimático final en la producción de angiotensina II (AT II).

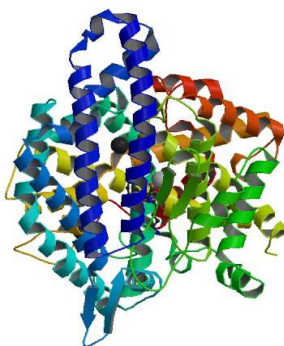


Figura 2. Estructura tridimensional de la enzima convertidora de angiotensina (Imagen de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank [RCSB-PDB] ID 1O86 [Natesh, Schwager, Sturrock y Acharya, 2003]).

Existen tres isoformas principales de ECA según Deddish et al. (1998), Fuchs et al. (2008), Santeliz, Romano, González y Hernández (2008) (Figura 3):

- 1) ECA somática: Está compuesta por una cadena polipeptídica de 1277 aminoácidos y se localiza en distintos tejidos celulares (vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro, principalmente). Posee dos dominios homólogos con un sitio activo cada uno: dominio C-terminal y dominio N-terminal (denominados de acuerdo a su posición en la cadena polipeptídica) que tienen la misma afinidad por el sustrato AT I pero diferente constante catalítica, siendo el C-terminal el responsable del 75 % de la actividad enzimática. Se ha demostrado que la inhibición de este mismo dominio es

necesaria y suficiente para el control de la presión arterial y la función cardiovascular, sugiriendo que es el sitio dominante para la conversión de AT I en AT II (Figura 3a).

- 2) ECA testicular: Es una forma de peso molecular más bajo (cuenta con 701 aminoácidos) y se encuentra en las células germinales del testículo. Solo tiene el dominio terminal en la región extracelular, por tanto, solo un sitio catalíticamente activo, el dominio C-terminal (Figura 3b).
- 3) ECA plasmática: Deriva de la segmentación proteolítica de la región C-terminal de la ECA somática desde la membrana celular y carece del dominio transmembrana en la porción intracelular; por lo tanto, corresponde a la región extracelular de la ECA somática (Figura 3c).

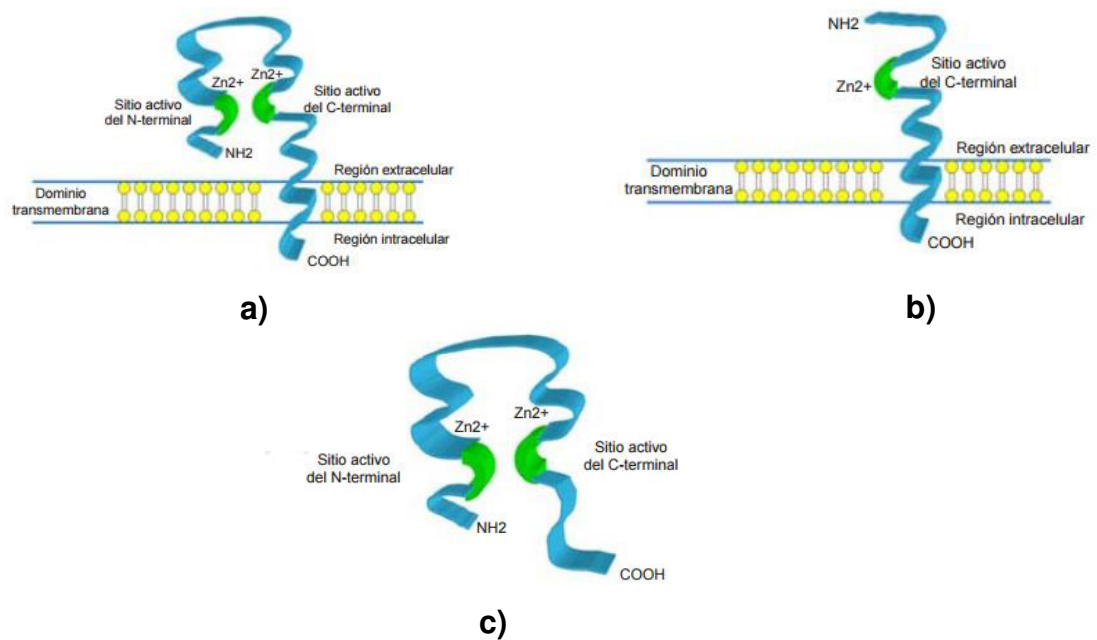


Figura 3. Isoformas de la ECA: a) ECA somática; b) ECA testicular; c) ECA plasmática (Adaptada de Santeliz et al., 2008).

La ECA hidroliza AT I removiendo el dipéptido del extremo C-terminal para formar el octapéptido AT II (forma biológicamente activa), el cual es un potente vasoconstrictor que produce un incremento en la presión arterial sistólica y diastólica. Una excesiva producción de este vasoconstrictor puede resultar en un ritmo de contracciones aceleradas y relajación limitada, lo cual conlleva al desarrollo

de una elevación de la presión arterial (hipertensión). El lugar principal de conversión de AT I en AT II son las células endoteliales y epiteliales encontradas en órganos como: corazón, riñón, vasos sanguíneos, células del músculo liso y pulmón (mayor actividad), así como en el plasma (Udenigwe y Aluko, 2012).

La AT II se transporta en el torrente sanguíneo y activa la corteza adrenal para secretar aldosterona y otros mineralocorticoides que actúan sobre los riñones de tres formas: incrementando la excreción de potasio, la retención de sal y la retención de agua, produciendo, por consiguiente, una elevación de la presión arterial (Manrique et al., 2009; Te Riet et al., 2015).

Entre otras funciones, la ECA metaboliza otros péptidos vasodilatadores como bradicinina y calicreína, que participan en otros sistemas de regulación de la presión arterial, por lo que su acción enzimática resulta en un incremento de la vasoconstricción y una disminución de la vasodilatación (Atlas, 2007; Alashi et al., 2014).

Por este motivo, la inhibición de la ECA es uno de los mecanismos reguladores de la presión arterial, que representa una de las estrategias farmacológicas más útiles para el tratamiento y control de la hipertensión (Segall, Covic y Goldsmith, 2007; Álvarez, 2009; Oddo y Arrizueta, 2011; Simaratanamongkol et al., 2014).

2.1.3 Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA)

Los primeros estudios realizados en la década de 1960 demostraron que los péptidos del veneno de la jararaca o víbora lanceolada (*Bothrops jararaca*) tenían la capacidad de inhibir la cininasa II, enzima que degrada la bradicinina, la cual después mostró ser idéntica a la estructura de la enzima convertidora de angiotensina (Weir y Dzau, 1999).

El primer inhibidor de la ECA usado fue el nonapéptido sintético teprotido, el cual mostró la disminución de la presión arterial en pacientes con hipertensión; poco tiempo después, se comprobó que además mostraba importantes efectos benéficos en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. El descubrimiento de este fármaco, motivó la búsqueda de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina oralmente activos. El primero de ellos fue el captopril [1-(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil-prolina] (Figura 4), que fue diseñado basado en inhibidores conocidos de otra carboxipeptidasa A, enzima metaloproteasa cuyo centro activo porta un ion de zinc (Zn^{2+}) como cofactor esencial para la hidrólisis peptídica (Atlas, 2007; Álvarez, 2009; De la Serna, 2010).

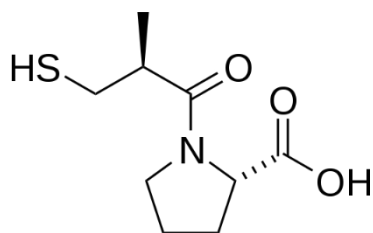


Figura 4. Estructura química del captopril, fármaco que actúa bloqueando el centro activo de la ECA (Adaptado del Catálogo de Sigma-Aldrich Co. LLC., 2015).

Los inhibidores de la ECA bloquean de manera competitiva la acción de la ECA (inhibiendo el dominio C) impidiendo la conversión de angiotensina I en angiotensina II, de esta forma reduciendo los niveles de AT II en circulación y locales; también disminuyen la secreción de aldosterona y vasopresina y la actividad del sistema nervioso simpático (Bonow, Mann, Zipes y Libby, 2014). Con el uso crónico de estos medicamentos, los niveles plasmáticos de AT II regresan a los valores previos al tratamiento (niveles de base), probablemente debido a la activación de vías alternas (Forclaz, Maillard, Nussberger, Brunner y Burnier, 2003; Atlas, 2007).

Los inhibidores de la ECA reducen la presión arterial principalmente al reducir la resistencia vascular renal, incrementar el flujo sanguíneo renal y promover la excreción de agua y sodio periféricas, produciendo un efecto sobre la frecuencia cardiaca, gasto cardiaco o volúmenes de líquidos corporales, lo que refleja la

preservación de los reflejos baro receptores; también restauran la relajación dependiente del endotelio y vuelven las arterias resistentes y menos delgadas (Bonow et al., 2014).

Debido a que la estructura de la ECA es idéntica a la de la cininasa II, los inhibidores de la ECA producen elevación de los niveles de bradicinina en algunos tejidos (pero no en la circulación); este efecto está potencialmente asociado con el aumento de la liberación de bradicinina dependiente de óxido nítrico y prostaglandinas vasoactivas, incluyendo la prostaciclina y prostaglandina E2. Estas acciones pueden contribuir de manera importante a los efectos benéficos característicos de este tipo de sustancias: vasodilatadores, antitrombóticos, antiaterogénicos y antiproliferativos; aunque también son responsables de los efectos secundarios de su uso, como la tos seca y de manera menos frecuente, el angioedema (Wing et al., 2003; Atlas, 2007).

2.1.4 Compuestos Bioactivos con Capacidad de Inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina

A la fecha, distintos trabajos de investigación se han enfocado en la búsqueda de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina a partir de productos naturales, los cuales pudieran poseer mejores perfiles farmacológicos sin los efectos adversos que producen los inhibidores sintéticos (Kohmura et al., 1989; Barbosa et al., 2006).

Existen reportes de alimentos que ejercen esta actividad de IECA, entre los que se encuentran fuentes vegetales como: orégano, menta, romero, salvia, limón (Kwon, Vatter y Shetty, 2006), semilla de chía (Orona-Tamayo, Valverde, Nieto-Rendón y Paredes-López, 2015), frijol (Ranilla, Kwon, Genovese, Lajolo y Shetty, 2010), aceite de canola (Alashi et al., 2014), aceite de oliva (Loizzo, Lecce, Boselli, Menichini y Frega, 2011), apio (Simaratanamongkol et al., 2014), manzana (Balasuriya y Rupasinghe, 2012), uva (Afonso, Passos, Coimbra, Silva, Soares-da-

Silva, 2013). Por otra parte, los alimentos de origen animal que han demostrado este efecto son los productos lácteos, como la leche fermentada, que contiene bacterias lácticas que son las responsables de esta actividad (Fuglsang, Rattray, Nilsson y Nyborg, 2003).

Además, se han reportado algunas sustancias naturales que actúan como inhibidores de la ECA y corresponden a distintas clases con diferente composición química; entre ellos destacan los péptidos, triterpenos, hidratos de carbono (monosacáridos y disacáridos) y compuestos fenólicos, entre los que se encuentran: taninos, ácidos fenólicos y flavonoides (Wanasundara et al., 2002; Al Shukor et al., 2013; Endringer, Oliveira y Braga, 2013; Orona-Tamayo et al., 2015).

El grupo de los compuestos fenólicos ha tenido un especial interés en los últimos años debido a su actividad IECA. Este efecto ha sido atribuido a su capacidad antioxidante y a la generación de complejos quelantes de metales con el centro activo de la enzima, por lo que se han aislado a partir de fuentes naturales y alimenticias con el fin de demostrar su actividad en modelos enzimáticos *in vitro* (Guerrero et al., 2012; Al Shukor et al., 2013) y modelos experimentales en animales (Mota, 2012; González, 2012; Alashi et al., 2014) y en humanos (efecto hipotensor) (Vuksan et al., 2007; Tavares, Oliveira, Tavares, Monteiro, da Cruz y Silva, 2014).

Algunos de los compuestos fenólicos de los que se ha reportado una elevada actividad IECA son: ácido cafeico y sus análogos (Bhullar, Lassalle-Claux, Touaibia y Rupasinghe, 2014), ácido tánico, quercetina y kaempferol (Al Shukor et al., 2013); glicósidos de quercetina, kaempferol y ácido *p*-cumárico (Oh et al., 2004), proantocianidinas (Lacaille-Dubois, Franck y Wagner, 2001) y flavan-3-ols (Actis-Goretta, Ottaviani, Keen y Fraga, 2003).

2.2 Compuestos Fenólicos

Los fitoquímicos están definidos como compuestos bioactivos no esenciales que se encuentran en plantas (fito se deriva del griego *phyto* que significa planta). Se estima que más de 5 000 fitoquímicos han sido identificados en frutas, vegetales, granos y otras plantas, principalmente clasificados como fenoles, carotenoides, vitaminas, alcaloides, compuestos nitrogenados y azufrados (Huang, Cai y Zhang, 2010).

Los compuestos bioactivos son definidos como: compuestos químicos que se encuentran de manera natural, presentes o derivados de plantas, animales o fuentes marinas, que promueven la salud o ejercen un efecto benéfico. Entre la gran diversidad de este grupo, los compuestos fenólicos han atraído un interés considerable debido a su amplia variedad de bioactividad (Kaur y Das, 2011; Aluko, 2012). Existen alrededor de 8 000 variantes en las clases y subclases de compuestos fenólicos. Generalmente son categorizados como: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, flavonoides, coumarinas, quinonas y otros. Se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que ligan estos anillos, como se muestra en la Figura 5 (Pérez et al., 2009; Huang et al., 2010).

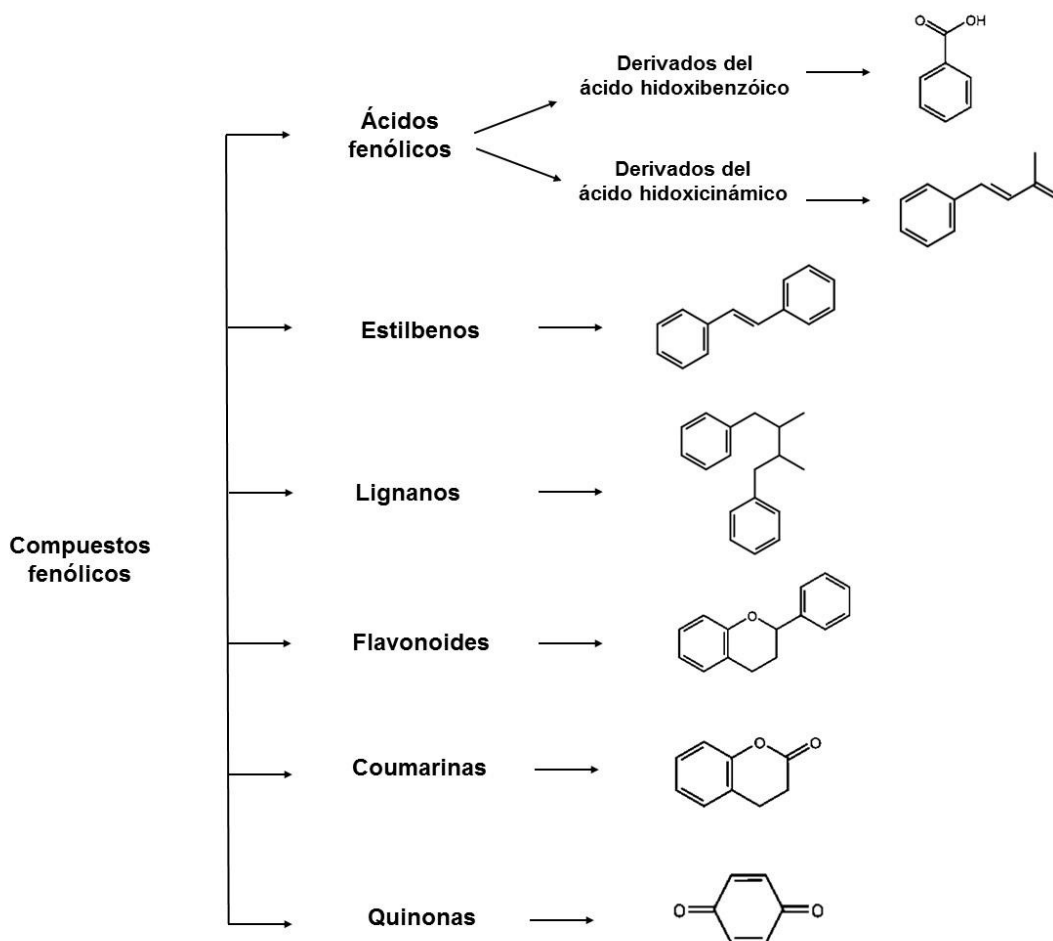


Figura 5. Estructura general de los compuestos fenólicos (Adaptado de Wollgast y Anklam, 2000; Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012; Shao y Bao, 2015).

Se originan principalmente en las plantas, de manera particular son sintetizados en gran cantidad en un órgano o tejido, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, infeccioso, etc.) (Scalbert y Williamson, 2000; Pérez et al., 2009).

El consumo de fitoquímicos con propiedades antioxidantes incluidos en la dieta, tiene un efecto benéfico a mediano y largo plazo en el funcionamiento de las actividades metabólicas y en la prevención de enfermedades coronarias y neoplásicas (Drago, López y Saíenz, 2006; Peluso y Palmery, 2015).

Las funciones fisiológicas y farmacológicas de los compuestos fenólicos pueden originarse debido a sus propiedades antioxidantes y sus funciones de captura de radicales libres y como reguladores de enzimas desintoxicantes. Además, sus actividades antioxidantes dependen de manera significativa, a la estructura que poseen, generalmente dependiendo del número y posiciones (disponibilidad), así como el patrón de sustitución de los grupos hidroxilos y la glicosilación de otros sustituyentes, la cual brinda efectos en la estabilidad de los radicales fenoxil por enlaces de hidrógeno o la movilidad de los electrones libres (Huang et al., 2010; Krishna y Renu, 2013).

2.2.1 Ácidos Hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos son un grupo de compuestos presentes en la pared celular vegetal, cuyos principales representantes son los ácidos: clorogénico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinápico; de los cuales el ferúlico y *p*-cumárico son los de mayor abundancia en la naturaleza. Químicamente su esqueleto está formado por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo. Son denominados ácidos hidroxicinámicos por la sustitución del grupo -OH en el anillo aromático (Collado, 2011; Mujica, Granito y Soto, 2012).

Estos compuestos tienen capacidad antioxidante y están presentes prácticamente en todos los alimentos vegetales y se encuentran distribuidos físicamente en varias partes de la planta, por ejemplo, en sus semillas, hojas, raíces y tallos. En escasas ocasiones son encontrados en forma libre, excepto en alimentos procesados. La forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza es como ésteres solubles o insolubles. Estos ésteres se forman con polisacáridos o azúcares simples, ácido quínico u otros ácidos carboxílicos como el ácido tartárico o el ácido shikímico, con esteroides y glicerol o con aminoácidos (Arellano, 2009; Martínez, 2013).

Destacan por ser buenos agentes antioxidantes, antibacteriales, además de poseer efectos antifúngicos, insecticidas y antiproliferativos (Collado, 2011; Martínez, 2013).

2.2.2 Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal (Pérez et al., 2009).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C₆-C₃-C_{6'}), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad C₃ proceden de la ruta del ácido shikímico. Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas (Figura 6) (Pérez et al., 2009).

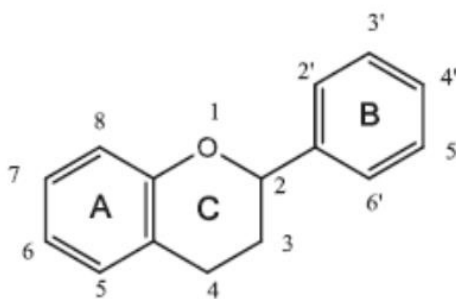


Figura 6. Estructura química del esqueleto de los flavonoides (Adaptado de Hodgson y Croft, 2010).

Estos compuestos actúan como secuestradores de radicales libres debido a la fácil donación de átomos de hidrógeno a los radicales libres. Su actividad antioxidante depende ampliamente de su estructura molecular (disponibilidad de

átomos de hidrógeno fenólicos) y del patrón de sustitución de los grupos hidroxilo, el cual ejerce un efecto en la estabilidad del radical fenoxilo resultante por enlaces de hidrógeno o por la deslocalización del electrón libre (Havsteen, 2002; Krishna y Renu, 2013).

Existen diferentes clases de flavonoides presentes en prácticamente todas las plantas comestibles, como frutas y vegetales; además, los flavonoides representan la clase más grande de compuestos fenólicos en hierbas medicinales y especies vegetales incluidas en la dieta (Huang et al., 2010). Algunos de los más comunes son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavan-3-oles, antocianidinas, isoflavonas, entre otros (Figura 7) (Kyselova, 2011).

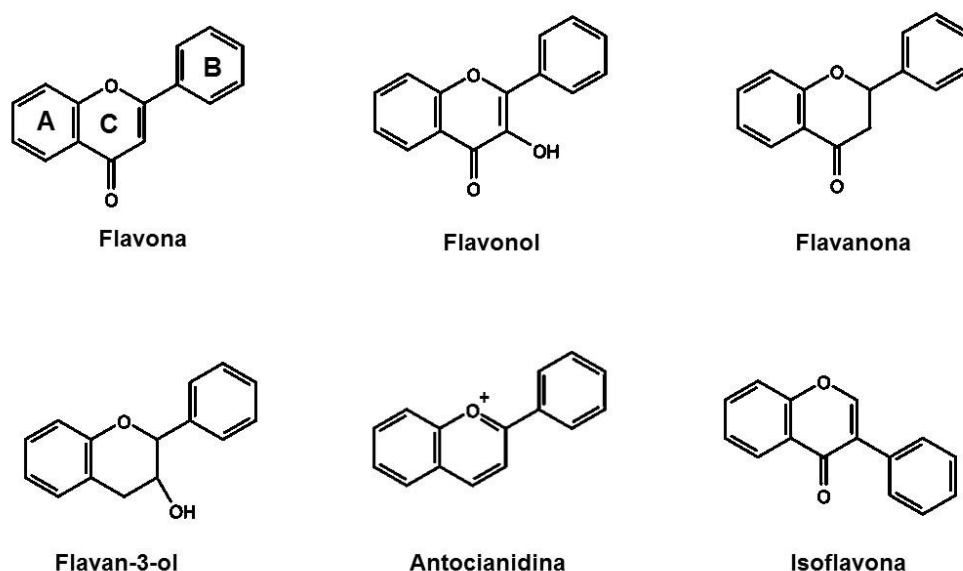


Figura 7. Estructura general de los flavonoides más comunes; en la estructura de la flavona se indica la posición de los anillos A, B y C (Adaptado de Kyselova, 2011).

El interés en los flavonoides presentes en la dieta ha aumentado en los últimos años debido a la publicación de varios estudios epidemiológicos que han mostrado una correlación inversa entre el consumo diario de flavonoles y flavonas, y una menor incidencia y mortalidad de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estos datos han despertado el interés por analizar los efectos de los flavonoides en el endotelio vascular, como demuestran el gran número de estudios experimentales e

incluso algunos clínicos (Havsteen, 2002; Pérez et al., 2009; Balasuriya y Rupasinghe, 2012; Kumar y Pandey, 2012; Quiñones et al., 2012).

2.2.2.1 Flavonoles

Los flavonoles se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Se conocen 450 tipos de agliconas y 900 tipos de glicósidos aproximadamente, de los cuales la gran mayoría se presentan como *O*-glucósidos unidos en las posiciones 3 y/o 7 (Collado, 2011).

Estos compuestos desempeñan actividades bioquímicas y farmacológicas en efectos: antiinflamatorios, antioxidantes, antialérgicos, antitrombóticos, antivirales, antihipertensivos, anticarcinogénicos y hepatoprotectores. Dentro de la planta juegan un papel vital en la defensa contra patógenos y predadores, además contribuyen en las funciones fisiológicas dentro de los periodos de maduración e inactividad. Son sintetizados a partir de los precursores derivados de fenilpropanoide y acetato (Winkel-Shirley, 2002).

Los flavonoles que predominan dentro de este grupo son: quercetina, kaempferol, miricetina, morina, galangina y sus glicósidos (Huang et al., 2010). La quercetina actúa como agente antiinflamatorio, antioxidante y anticancerígeno; posee la función junto con otros flavonoides de mejorar la integridad estructural de red del colágeno de los vasos sanguíneos. También se han reportado efectos en la regeneración celular, síntomas menopáusicos y ulceraciones, atribuyendo como responsables a los compuestos antioxidantes polifenólicos quercetina y miricetina (Krishna y Renu, 2013).

2.2.3 Compuestos Fenólicos y Enfermedad Cardiovascular

En los últimos años, los alimentos y bebidas ricas en polifenoles se han considerado como posibles agentes preventivos para un rango de condiciones desde la hipertensión hasta la enfermedad cardiovascular, infarto, enfermedad cerebral, y enfermedades neurodegenerativas (Ghosh y Scheepens, 2009).

Se ha reportado la existencia de productos naturales ricos en flavonoides que poseen la capacidad de inducir una reducción de presión arterial, además de una actividad inhibitoria de ECA, lo cual abre la posibilidad de que su consumo, puede tener un efecto similar a los medicamentos sintéticos con la actividad de los inhibidores de la ECA y puede aportar beneficios a la salud, sin generar efectos secundarios (Afonso et al., 2013).

El consumo de alimentos que contienen antioxidantes está relacionado con la disminución de la presión arterial y la vasodilatación periférica; este efecto puede ser debido a los flavonoides, los cuales muestran actividad a nivel del óxido nítrico vascular e intervienen en el control de la presión sanguínea (Gómez, González, Bravo, Vaquero y Bastida, 2011).

Además de los efectos antioxidantes de los flavonoides, hay enzimas cuya actividad es inhibida (por ejemplo, enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno, como la xantina oxidasa y la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato oxidasa); ya que pueden interactuar con muchas dianas moleculares involucradas en la fisiopatología de la enfermedad isquémica cardíaca y en el accidente cerebrovascular. Se conoce su actividad en múltiples mecanismos que operan tanto en niveles de prevención como en la fase aguda de eventos cardiovasculares (Duarte, Galindo y Pérez, 2011; Peluso y Palmery, 2015).

Hay evidencias de que *in vitro*, los flavonoides ejercen: 1) efectos vasodilatadores dependientes e independientes del endotelio, 2) efecto protector sobre el óxido nítrico y la función endotelial bajo condiciones de estrés oxidativo, 3) efectos antiagregantes plaquetarios, 4) inhibición de la oxidación de lipoproteínas

de baja densidad (LDL), 5) reducción de las moléculas de adhesión y otros marcadores inflamatorios y 6) prevención en el daño neuronal oxidativo e inflamatorio (Hodgson y Croft, 2010; Duarte et al., 2011; Peluso y Palmery, 2015).

En modelos animales, la quercetina produce efectos antihipertensivos y antiaterogénicos, previene la disfunción endotelial y protege al miocardio del daño isquémico. En humanos, la quercetina origina un efecto antihipertensivo; algunas evidencias también indican efectos diferenciales en función de los antecedentes genéticos de los pacientes (Schewe, Steffen y Sies, 2008; Mladěnka, Zatloukalová, Filipský y Hrdina, 2010; Duarte et al., 2011).

Los polifenoles que han demostrado un posible papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares en estudios llevados a cabo *in vitro*, sólo podrán ser verdaderamente efectivos si estos compuestos alcanzan los tejidos donde han de ejercer su acción en concentraciones suficientes para tener un efecto biológico. Debido a esto, es esencial conocer la absorción y el metabolismo de estos polifenoles en el organismo humano mediante estudios de su biodisponibilidad *in vivo*. Sin embargo, poco se conoce sobre las formas bioactivas de estos compuestos fenólicos *in vivo* y los mecanismos exactos mediante los cuales contribuyen en la prevención de enfermedades (Schewe et al., 2008; Mladěnka et al., 2010; Hodgson y Croft, 2010).

A pesar de que existen reportes de investigación sobre el estudio de la biodisponibilidad de polifenoles (su absorción y formas conjugadas con glucurónido y con sulfato), muy pocos se centran en el estudio de los metabolitos mayoritarios formados *in vivo*, tras la degradación de los constituyentes naturales por la acción de las enzimas de bacterias presentes en el colon y su posterior absorción (Tomás, 2003). Debido a la baja biodisponibilidad de los flavonoides, el tracto gastrointestinal pudiera ser el blanco primario de estos compuestos y sus metabolitos. A este nivel, distintos mecanismos de acción pudieran ejercer efecto después de su consumo, tanto agudo como crónico (Zapata y Cardona, 2014; Peluso y Palmery, 2015).

Se ha reportado la presencia de compuestos bioactivos en diversas especies de salvia y plantas relacionadas con actividad biológica, como es el caso de la *Salvia hispanica* L; la cual ha despertado el interés por sus propiedades cardioprotectoras, entre ellas el efecto hipotensor, específicamente en la capacidad de inhibición de ECA (González, 2012).

Algunos extractos de salvia como la *Salvia scutellarioides*, *Salvia miltiorrhiza* y *Salvia hispanica* han demostrado efecto antihipertensivo e inhibidor de la ECA en ratas con hipertensión inducida, así como efecto vasorelajador del extracto metanólico en anillos aislados de aorta de rata y efecto de vasodilatación independiente de endotelio (Arenas, Pachón, Méndez y Guzmán 2009; González, 2012; Mota, 2012; Ng et al. 2011).

De acuerdo a lo reportado por González (2012), diferentes extractos de chía presentaron actividad de IECA, siendo el metanólico el que demostró tener mejor actividad *in vitro* e *in vivo* en un ensayo en ratas con hipertensión inducida, en donde se observó un efecto hipotensor con una dosis de 400 mg/kg de esta semilla. Al analizar la función renal y hepática de dichos animales, los resultados mostraron que la administración de este extracto no produce daño en estos órganos; dicho extracto contenía azúcares, óxidos fenólicos, coumarinas, insaturaciones, esteroides, terpenos y grupos carbonilo y se sugiere como posibles responsables del efecto hipotensor, a los glucósidos de terpenos y glucósidos de fenólicos.

2.3 Chía (*Salvia hispanica* L.)

La chía pertenece a la familia Lamiaceae (familia de la menta), es una planta herbácea, anual, de 1 a 1.50 m de altura, con tallos cuadrangulares, acanalados y vellosos; hojas opuestas de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho, pecioladas, aserradas y flores reunidas en espigas auxiliares o terminales. En la mayor parte de las variedades las flores son azules, pero en la variedad de semilla blanca, sus flores también son blancas. Esta planta se cultiva para la producción de semilla, de

la que se obtienen hasta 3000 kg por hectárea; cada fruto lleva cuatro semillas pequeñas de 2 mm de largo por 1.5 mm de ancho, en forma oval, lisas, brillantes. Existen diferentes genotipos de color que incluyen negras, blancas y negras con puntos blancos (Figura 8) (Cahill, 2003; Ayerza y Coates, 2009; Ulbricht et al., 2009; Ayerza, 2013).

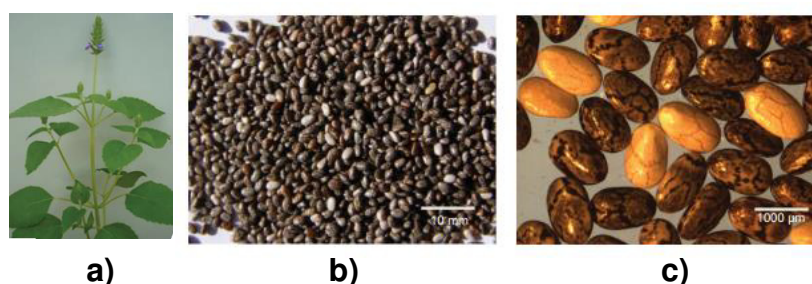


Figura 8. *Salvia hispanica* L. a) Fotografía de la parte aérea de la planta; b) Semilla de chía; c) Imagen ampliada de la semilla de chía (Adaptado de Mohd et al., 2012 y Muñoz, Cobos, Díaz y Aguilera, 2013).

Por siglos, la semilla de chía fue utilizada por los indígenas del oeste y del sur de México y Centroamérica, la cual era incorporada en distintos alimentos de la dieta, representando una de las fuentes energéticas más importantes en la alimentación de los aztecas (Ayerza, 1996). Sin embargo, con la caída de la civilización y el paso del tiempo, su cultivo fue olvidado, siendo a finales del siglo pasado que el interés por la chía resurgió (Ulbricht et al., 2009).

Se considera un alimento funcional con distintos beneficios a la salud debido a su composición química; posee una cantidad significativa de lípidos (aproximadamente el 30 – 40 % de su peso), de los cuales casi el 60 % corresponde a los ácidos grasos ω -3, convirtiéndola en la mayor fuente de este ácido graso esencial de origen vegetal. También es una buena fuente de fibra dietética (más del 30 %), de proteína (20 %), siendo mayor al contenido de otros cultivos como trigo, maíz, arroz, cebada, avena y amaranto) y de compuestos antioxidantes. Se ha reportado que la composición puede variar de acuerdo al lugar de procedencia y a las condiciones del cultivo (Bushway, Belya y Bushway, 1981; López y Ortega, 2014; Silveira y Salas-Mellado; 2014; Ullah et al., 2016).

La diversidad, así como la concentración de ingredientes funcionales y compuestos en la semilla de chía, pueden ayudar a mantener una dieta saludable y agregar un valor nutritivo para la preparación de productos alimenticios con interés comercial (Reyes-Caudillo, Tecante y Valdivia-López, 2008; Muñoz et al. 2013; Silveira y Salas-Mellado; 2014; Amato et al., 2015).

2.3.1 Compuestos Fenólicos de la Semilla de Chía

La semilla de chía contiene una cantidad de compuestos con potente actividad antioxidante, entre los más importantes se encuentran los compuestos fenólicos, tales como ácidos hidroxicinámicos: clorogénico y cafeico y como flavonoles: miricetina, quercetina y kaempferol (Figura 9). La importancia de los mismos, radica en su protección frente a la oxidación lipídica que afecta tanto la salud de los consumidores como la calidad de los alimentos, con el posible deterioro de las características organolépticas, funcionales y nutricionales (Taga, Miller y Pratt, 1984).

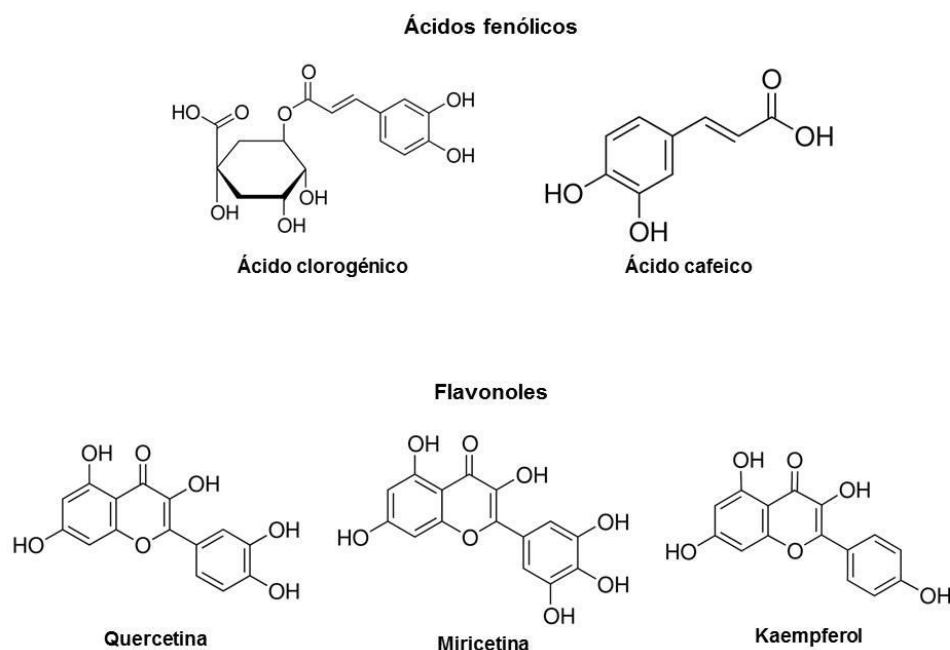


Figura 9. Estructura química de los compuestos fenólicos de la semilla de chía. (Adaptado del Catálogo de Sigma-Aldrich Co. LLC., 2015).

El contenido de los principales compuestos fenólicos en extractos de semilla de chía ha sido evaluado en diversos estudios (Tabla 1) (Taga et al., 1984; Reyes-Caudillo et al., 2008; Ayerza, 2013; Silveira y Salas-Mellado; 2014; López y Ortega, 2014).

Tabla 1. Estudios de identificación de compuestos fenólicos en semilla de chía

Autor	Taga et al., 1984	Reyes-Caudillo et al., 2008	Ayerza, 2013	Silveira y Salas-Mellado, 2014	López y Ortega, 2014
Procedencia de la semilla	SD	Jalisco y Sinaloa, México	Ecuador, Bolivia y Paraguay	Sao Paulo, Brasil	Jalisco, México
Tipo de extracción	•Metanólica: previo desgrasado con éter de petróleo	•Etanólica	•Acetónica	•Metanólica: previo desgrasado con hexano	•Etanólica •Metanólica
Método de cuantificación	TLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC
Unidades de cuantificación	mg/g				
Compuestos fenólicos sin hidrólisis (mg/g)	Ácido cafeico: 1.19	Ácido clorogénico: 0.0459 – 0.102	Miricetina: 0.119 – 0.121	Ácido clorogénico: 0.005	Ácido clorogénico: 0.004 – 0.005
	Ácido clorogénico: 2.52	Ácido cafeico: 0.003 – 0.0068 Glicósidos de quercetina: 0.248 – 0.3248 Glicósidos de kaempferol: 0.403 – 0.503	Quercetina: 0.006 Kaempferol: 0.024 – 0.025 Ácido clorogénico: 0.214 – 0.235 Ácido cafeico: 0.141 – 0.156	Ácido cafeico: 0.031 Quercetina: 0.0002 Glicósidos fenólicos: 0.606	Ácido cafeico: 0.015 – 0.035 Miricetina: 0.0002 – 0.0004
Compuestos fenólicos con hidrólisis (mg/g)	Ácido cafeico: 2.43	Quercetina: 0.15 – 0.268	Lignanos: 0.409 – 0.432		Ácido clorogénico: 0.0001 – 0.0006
	Miricetina: 0.99	Kaempferol: 0.36 – 0.509			Ácido cafeico: 0.041 – 0.047
	Quercetina: 0.06			N A	Miricetina: 0.012 – 0.027
	Kaempferol: 0.32				Quercetina: 0.016 – 0.027 Kaempferol: 0.002 – 0.003

NA: No Analizado; TLC: cromatografía de capa fina; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

Todos ellos demostraron la presencia de los compuestos antes mencionados con variación importante en las concentraciones reportadas, estas diferencias pueden deberse a la procedencia de la semilla, al solvente utilizado y a la técnica de cuantificación, siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la más empleada para lograr la separación e identificación de los mismos. Los autores reportaron la presencia de los compuestos fenólicos en forma de glicósidos y en forma libre, cuantificando su aglicona después de un tratamiento de hidrólisis para lograr la ruptura del enlace glicosídico entre ellos. Los diferentes métodos de extracción utilizados, hace difícil la comparación de las concentraciones de estos compuestos antioxidantes.

A su vez, se ha demostrado una correlación entre la concentración de compuestos fenólicos con la actividad antioxidante en esta semilla (Reyes-Caudillo et al., 2008; Ulbricht et al., 2009; Sargi et al., 2013).

En los productos naturales, la mayoría de estos compuestos se encuentran en forma de glicósido y dependiendo del solvente y método de extracción, estos y otros metabolitos secundarios que poseen, se pueden concentrar con el fin de potencializar los efectos que ejercen estas sustancias. Sin embargo, las técnicas de separación y purificación, permiten identificar al compuesto o compuestos responsables de las actividades biológicas con efecto benéfico para el organismo, con el fin de obtener una alternativa saludable para la integración del tratamiento y prevención de las enfermedades que representan un problema de salud pública mundial (Schieber, 2012; Mohd et al., 2012).

Es por ello que en la presente investigación se busca profundizar en la identificación de los compuestos fenólicos contenidos en extractos de semilla de chíá que ejercen actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*.

III. HIPÓTESIS

Las fracciones semipurificadas de extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) presentan mayor actividad IECA que los extractos crudos.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar la actividad inhibitoria *in vitro* de los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólico y metanólico de semilla de *Salvia hispanica* L. (en forma cruda y semipurificada) sobre la enzima convertidora de angiotensina.

4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener extractos etanólico y metanólico de semilla de chía.
2. Determinar la actividad inhibitoria de los extractos etanólico y metanólico de semilla de chía sobre la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*.
3. Semipurificar los extractos etanólico y metanólico de chía por cromatografía en columna.
4. Evaluar la actividad inhibitoria sobre la enzima convertidora de angiotensina de las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna.
5. Identificar los compuestos fenólicos presentes en las fracciones con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia General de Trabajo

El esquema general de análisis propuesto para alcanzar los objetivos descritos se presenta en la Figura 10.

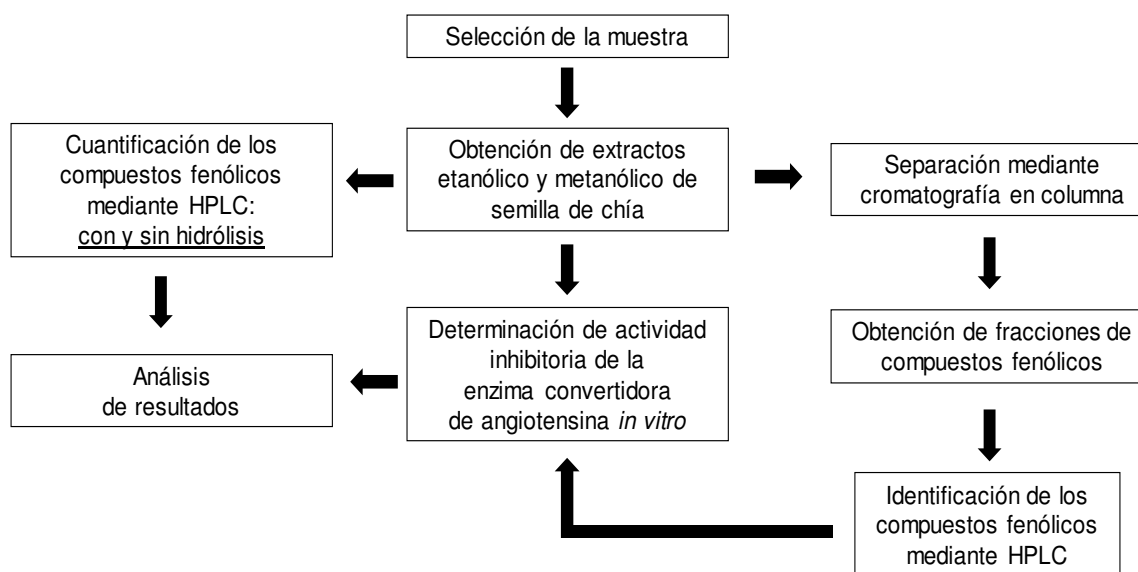


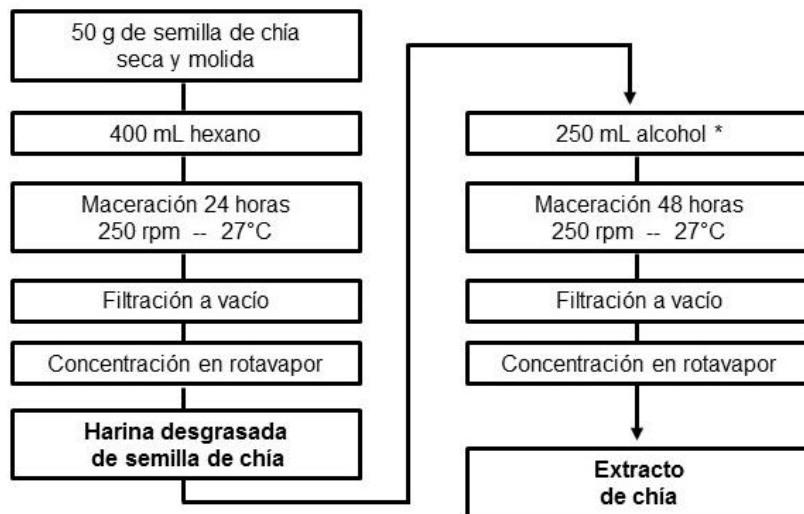
Figura 10. Estrategia general de trabajo

5.2 Material Biológico

Semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) comercializada y distribuida por la empresa Xiomega del estado de Jalisco, México, la cual fue adquirida en un supermercado en el departamento de farmacia del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

5.3 Obtención de extractos de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.)

Los extractos etanólico y metanólico de semilla de chía se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por López y Ortega (2014) haciendo algunas modificaciones. El proceso se resume en la Figura 11.



* alcohol: etanol o metanol

Figura 11. Obtención de extractos de semilla de chía

El material biológico se pesó y se colocó en charolas de aluminio a secar en horno (Felisa) a 60° C durante 24 horas; posteriormente fue pulverizado por acción mecánica utilizando un molino analítico (IKA A11 basic), obteniendo así la harina de semilla de chía.

Para obtener los extractos, fue necesario un desgrasado previo de la harina de chía utilizando hexano (1:8 p/v) con el fin de retirar el aceite de la semilla, ya que éste interfiere con la extracción de los compuestos. Se pesaron 50 g de chía (seca y molida) y se colocaron en frascos de vidrio por triplicado; a cada uno se les adicionó 400 mL de hexano y se dejaron en maceración perfectamente cerrados con agitación constante a 250 rpm durante 24 horas a 27° C (Incubadora Shel Lab Modelo No. 1575). Se filtraron utilizando embudos de Büchner y filtros Whatman No. 1 y posteriormente mediante vacío, con filtro de fibra de vidrio (Whatman, Ø47 mm). Finalmente, se concentraron en un rotavapor (Hanhnvapor HS-2001 NS) y se dejaron secando a temperatura ambiente en una campana de extracción para lograr la evaporación completa de los solventes.

A continuación, para obtener los extractos etanólico y metanólico, se siguió la misma metodología descrita previamente modificando la adición del solvente, en este caso 250 mL de etanol para el extracto etanólico y 250 mL de metanol para el extracto metanólico. El tiempo de maceración fue de 48 horas para cada uno de ellos, siguiendo después con los procesos de filtrado y rotaevaporación.

Los solventes empleados fueron previamente destilados en el rotavapor con el fin de eliminar impurezas y metales pesados que pudieran interferir en la determinación enzimática.

5.4 Cuantificación de los Compuestos Fenólicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los extractos etanólico y metanólico de semilla de chía fueron analizados mediante HPLC con el fin de conocer la concentración de compuestos fenólicos.

Se siguió metodología reportada por López y Ortega (2014) empleando un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) provisto con detector de diodos UV/Vis (Thermo Scientific Spectra System) fijado a una longitud de onda de 354 nm.

La fase estacionaria utilizada fue una columna Ultra AQ C18-RP (150 mm x 4.6 mm; 5 µm; RESTEK). Las condiciones del método consistieron en: fase móvil: A) agua-ácido acético (98:2); B) acetonitrilo grado HPLC (TEDIA). El gradiente de elución fue 90 % a 55 % de A y 10 % a 45 % de B los primeros 3 minutos y 55 % a 90 % de A y 45 % a 10 % de B en 17 minutos; la temperatura del horno se ajustó a 40° C, el flujo a 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 µL. Las soluciones estándar y muestras fueron filtradas con un filtro de jeringa de membrana de nylon de 0.45 µm.

Los estándares de los compuestos fenólicos utilizados fueron: ácido cafeico, ácido clorogénico, miricetina, quercetina y kaempferol (Sigma-Aldrich). Se realizaron curvas de calibración de nueve puntos de cada uno de ellos (0.001 – 1 mg/mL).

El agua utilizada en esta determinación fue filtrada y deionizada en un equipo de ultrapurificación con UV (Millipore Simplicity) a 18.2 Ω cm a 25° C.

Los extractos de chía fueron resuspendidos en 1 mL de metanol 70 % grado HPLC (FERMONT) para su análisis.

5.4.1 Hidrólisis Ácida de Extractos de Semilla de Chía

Los extractos de semilla de chía fueron sometidos a un proceso de hidrólisis con el fin de romper el enlace glicosídico entre la aglicona (compuesto de forma libre) y su forma conjugada como glicósido (compuesto unido a azúcar) para ser cuantificado de ambas formas.

Se siguió la metodología de Taga et al. (1984) adaptada por López y Ortega (2014) como se describe a continuación: se tomaron alícuotas de 100 mg de los extractos y se disolvieron en 3 mL de metanol-HCl 2 N (FERMONT). Las muestras fueron cerradas herméticamente y calentadas a 100° C durante 45 minutos. Después del calentamiento, se añadieron 3 mL de agua.

Con ayuda de un embudo de separación, se realizó la extracción por triplicado utilizando 2 mL de éter dietílico (CTR) en cada una de ellas; la fase apolar fue recuperada en un tubo diferente y la fase acuosa fue descartada.

Las tres fases de éter (apolares) se combinaron y fueron evaporadas a sequedad. Por último, el residuo fue resuspendido en 1 mL de metanol 70 % grado HPLC (FERMONT), para su posterior análisis, siguiendo la metodología antes descrita.

5.5 Determinación de la Actividad Inhibitoria sobre la Enzima Convertidora de Angiotensina *in vitro*

Este análisis se siguió bajo el método propuesto por Wu, Aluko y Muir (2002) basado en la cuantificación de ácido hipúrico mediante la actividad que ejerce la enzima convertidora de angiotensina (ECA) sobre el sustrato Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL), esquematizado en la Figura 12.

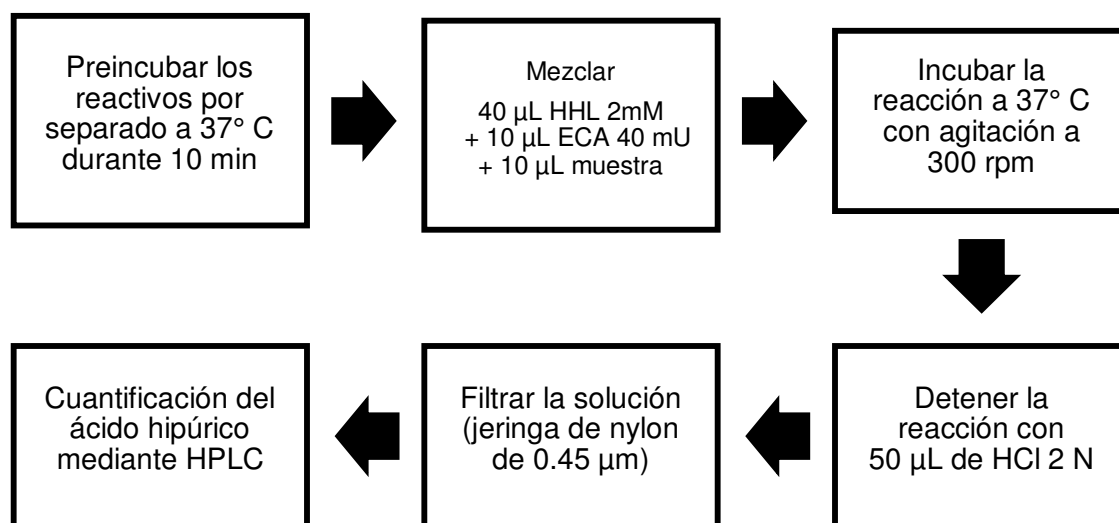


Figura 12. Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina *in vitro*

El ensayo consistió en la simulación *in vitro* de la reacción enzimática en el organismo, utilizando 10 µL de muestra, 10 µL de solución 40 mU de enzima convertidora de angiotensina de pulmón de conejo (Sigma-Aldrich) y 40 µL de solución 2 mM de sustrato Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) (Sigma-Aldrich). La enzima y el sustrato fueron disueltos en buffer de boratos (100 mM) (Sigma-Aldrich) con NaCl (300 mM) (CTR) ajustado a pH 8.3.

La muestra y los reactivos fueron preincubados por separado a 37° C durante 10 minutos. Posterior a esto, se incubó la mezcla de reacción (sustrato, enzima y muestra) a 37° C durante 60 minutos a 300 rpm. La reacción se detuvo utilizando 50 µL de HCl 2 N y por último la solución con el producto de la reacción se filtró con un filtro de jeringa de membrana de nylon de 0.45 µm para su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se preparó un blanco el cual consistió en la adición de buffer en lugar de enzima, así como un control positivo, el cual contenía buffer en lugar de muestra.

El análisis del producto generado en la reacción siguió la metodología de Eriz, Sanhueza, Roeckel y Fernández (2011), la cual consiste en la cuantificación del ácido hipúrico (Sigma-Aldrich) mediante HPLC empleando una curva de calibración (25 – 1000 µM) del estándar. Las condiciones del método fueron las siguientes:

Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos UV/Vis (Thermo Scientific, Spectra System) fijado a 228 nm. Como fase estacionaria se utilizó una columna Synchronis C18-RP (150 mm x 4.6 mm; 5 µm) (Thermo Scientific) y como fase móvil: A) Ácido trifluoroacético al 0.05 % en agua (Sigma-Aldrich) y B) Ácido trifluoroacético al 0.05 % en acetonitrilo (TEDIA), siguiendo una elución isocrática de 75 % de A y 25 % de B. El tiempo de corrida fue de 15 minutos, con un flujo de 0.70 mL/min y volumen de inyección de 20 µL.

El agua utilizada en esta determinación fue filtrada y deionizada en un equipo de ultrapurificación con UV (Millipore Simplicity) a 18.2 Ω cm a 25° C.

Los resultados fueron comparados con una curva de calibración (1 – 50 nM) de captopril (Sigma-Aldrich), utilizado como el control de la reacción enzimática siguiendo metodología de Rufián-Henares y Morales (2007).

El cálculo de % de inhibición enzimática se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\% IECA = 100 - \left(\frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

donde A es la concentración de ácido hipúrico de la muestra, B es la concentración del blanco y C la del control positivo.

Se graficó la concentración de extracto (mg/mL) contra el porcentaje de inhibición de la ECA correspondiente, calculando la concentración necesaria para

inhibir la actividad enzimática en un 50 % (IC_{50}), para la cual se realizó una transformación logarítmica de los valores de las concentraciones de extracto empleando el programa computacional ED50plus v1.0 (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) (Vargas, 2010).

5.6 Separación de Compuestos Fenólicos de los Extractos Etanólico y Metanólico de Chía

La cromatografía en columna se encuentra dentro de los métodos químicos analíticos más utilizados para separación y purificación de mezclas de compuestos orgánicos (Tsuda, 2004). Para la separación de compuestos fenólicos de los extractos etanólico y metanólico de semilla de chía, se utilizó una columna de cromatografía montada y equilibrada con Sephadex LH-20 (LH20100 Sigma-Aldrich).

La metodología que se siguió en esta etapa fue descrita por Pablo (2011), con algunas modificaciones que se muestran en el esquema de la Figura 13.

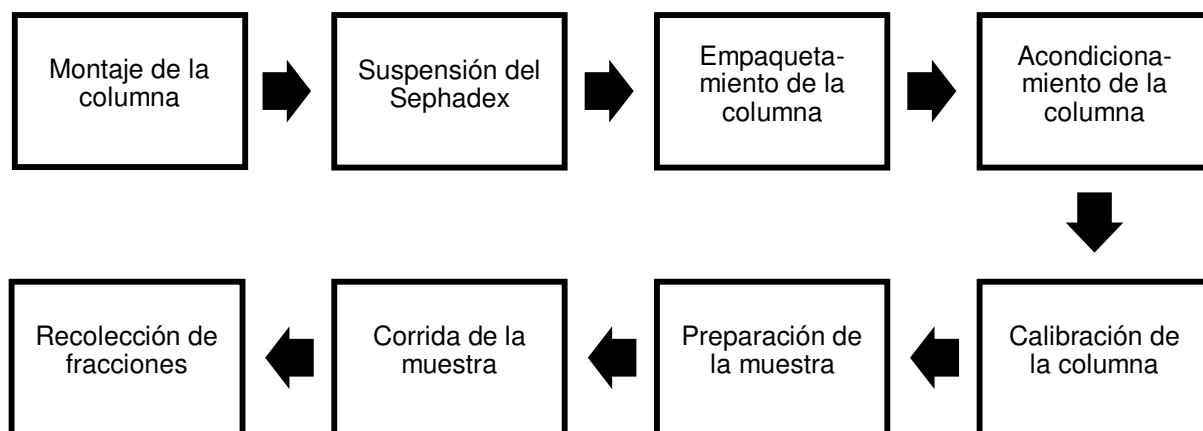


Figura 13. Separación cromatográfica de extractos de semilla de chía

Se utilizó una columna de vidrio de 50 cm de largo y 2.5 cm de diámetro interno empacada con 30 g de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich); el gel se activó con el

solvente de elución manteniéndolo a temperatura ambiente durante 90 minutos. El eluyente fue el solvente utilizado en cada uno de los extractos (etanol y metanol, respectivamente). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y las muestras fueron colectadas en tubos de 4 mL.

Previo a la separación, se procedió a calibrar la columna utilizando como marcador azul dextrano 1:1 (agua:eluyente), con el fin de determinar el volumen de vacío (V_0). La absorbancia fue analizada en el espectrofotómetro utilizando como longitud de onda 618 nm.

Una vez empaquetada la columna, se pesaron 300 mg del extracto de semilla de chía redisueltos en el solvente de elución correspondiente. Se recolectaron fracciones de 2 mL cada una en tubos de vidrio, como se mencionó previamente. La separación de los extractos se realizó por triplicado y se determinó el volumen de elución (V_e) de cada muestra.

Después de la recolección de las fracciones, se realizó un análisis espectrofotométrico de cada uno de los eluidos utilizando dos longitudes de onda específicas para el grupo de compuestos fenólicos de interés que han sido reportadas previamente (Kumar y Pandey, 2013): para ácidos hidroxicinámicos, 280 nm y para flavonoides, 280 y 354 nm; las cuales fueron analizadas en función de las características de la estructura química, particularmente la lectura de los anillos fenólicos de los compuestos. A partir del valor de las absorbancias (densidad óptica) de las muestras, se comprobó la separación cromatográfica de los compuestos.

5.7 Selección y Tratamiento de las Fracciones

De acuerdo al análisis espectrofotométrico de las fracciones, se seleccionaron aquellas que se encontraron en cada uno de los picos obtenidos derivados de la separación cromatográfica (la fracción con mayor absorbancia).

A estas fracciones se les determinó el coeficiente de distribución (K_{av}) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$K_{av} = \left(\frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \right)$$

donde V_e = Volumen de elución, V_o = Volumen de vacío y V_t = Volumen total.

Las fracciones se concentraron utilizando un equipo de vacío (CentriVap Concentrador de Centrífuga, Labconco,) ajustado a 40° C durante 60 minutos para evaporar el solvente por completo y ser utilizadas en la actividad IECA y en las determinaciones de la identificación de los compuestos fenólicos.

5.8 Identificación de Compuestos Fenólicos en las Fracciones

Los compuestos fenólicos presentes en las fracciones fueron identificados utilizando un procedimiento similar al empleado en los extractos crudos.

Se realizó la identificación utilizando las fracciones concentradas que fueron seleccionadas previamente, siguiendo la descripción metodológica del apartado 5.4; enseguida se realizó la identificación de los compuestos en las fracciones antes y después de un tratamiento de hidrólisis (metodología apartado 5.4.1) para completar el análisis.

5.9 Determinación de la Actividad Inhibitoria de las Fracciones de los Compuestos Fenólicos

Para este análisis se siguió el método descrito previamente en el apartado 5.5 utilizando como muestra las fracciones obtenidas en la separación de compuestos fenólicos mediante cromatografía en columna, en lugar de los extractos crudos de semilla de chía.

5.10 Plan de Análisis Estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado y el análisis de los datos se llevó a cabo mediante estadística descriptiva.

Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 22.0 (Armonk, NY, IBM Corporation). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA de un factor) para establecer diferencias entre extractos crudos y eluidos con un valor de significancia $p \leq 0.05$, cumpliéndose los supuestos necesarios del análisis (normalidad, homocedasticidad y datos aleatorios de tratamientos independientes); de igual forma se utilizó la prueba post-hoc de Tukey para probar la diferencia entre tratamientos.

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención de Extractos de Semilla de Chía

La extracción de los compuestos fenólicos de la semilla de chía requirió un desgrasado previo debido a las características químicas-nutricionales de la semilla, así como a la obtención de los compuestos en forma de glicósidos, los cuales no son miscibles en fase grasa.

Los porcentajes de rendimiento y de grasa se concentran en la Tabla 2; en donde se observó que el extracto etanólico presentó mayor rendimiento significativo que el metanólico y el contenido de grasa extraída de la semilla fue equivalente a más de una tercera parte de su peso.

Tabla 2. Porcentaje de rendimiento y extracción de grasa de la muestra

Extracto	% Rendimiento	% Grasa extraída de la semilla
Etanólico	5.1 ± 1.0 ^a	36.2 ± 1.9
Metanólico	2.5 ± 0.5 ^b	

n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; ^{a,b} = Indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los porcentajes de rendimiento de los extractos

6.2 Estandarización del Método de Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía mediante HPLC

Con la metodología descrita en el apartado 5.4, se llevó a cabo la estandarización de la técnica para la separación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos que se encuentran en la semilla de chía.

En la Figura 14 se presenta el cromatograma de los cinco estándares evaluados: ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol.

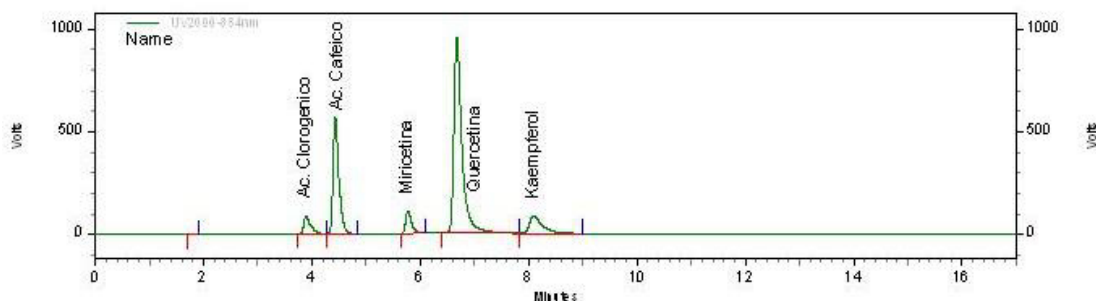


Figura 14. Cromatograma de los estándares de compuestos fenólicos evaluados

En la Tabla 3 se presentan los datos de la estandarización del método; como el tiempo de retención y el coeficiente de determinación (r^2), el cual es un estadístico que determina la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de los mismos que puede explicarse por el modelo. Estos valores fueron obtenidos a partir de las curvas de calibración realizadas de cada compuesto.

Tabla 3. Tiempo de retención y coeficiente de determinación de los estándares de compuestos fenólicos

Estándar	Tiempo de retención (min)	r^2
Ácido clorogénico	3.892	0.998978
Ácido cafeico	4.432	0.998585
Miricetina	5.773	0.999358
Quercetina	6.675	0.999463
Kaempferol	8.095	0.999378

Los límites de detección de los diferentes estándares de compuestos fenólicos fueron determinados de acuerdo con los valores mínimos detectables para cada uno de los compuestos y los límites de cuantificación, con la desviación estándar de las concentraciones mínimas obtenidas, restando el ruido encontrado para ambos valores (Tabla 4).

Tabla 4. Límites de detección y cuantificación de los estándares de compuestos fenólicos

Estándar	Límite de detección (mg/mL)	Límite de cuantificación (mg/mL)
Ácido clorogénico	0.0006	0.003
Ácido cafeico	0.0003	0.001
Miricetina	0.0002	0.002
Quercetina	0.0001	0.001
Kaempferol	0.0003	0.006

6.3 Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía

El análisis de los extractos mediante HPLC demostró la presencia de compuestos fenólicos en forma libre (agliconas) y unidos a azúcares (glicósidos). Por esta razón, los extractos fueron cuantificados previamente y después de realizar un tratamiento de hidrólisis ácida con el fin de liberar las agliconas de los glúcidos unidos.

De manera general, el extracto metanólico presentó la mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides en forma de aglicona (Tabla 5). Se observó que aproximadamente el 73 % de los compuestos fenólicos en el extracto metanólico se encontraron en forma de glicósidos, mientras que solo un 50 %, en el etanólico.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de chía (mg/100 g)

		Ácidos hidroxicinámicos		Flavonoides		
Extracto		Ácido clorogénico	Ácido cafeico	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Sin hidrólisis	Etanólico	0.29 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.14 ^a	0.18 ± 0.15 ^a
	Metanólico	0.82 ± 0.25 ^{a,b}	0.95 ± 0.14 ^b	1.20 ± 0.20 ^b	0.35 ± 0.09 ^a	0.47 ± 0.09 ^a
Con hidrólisis	Etanólico	0.69 ± 0.20 ^{a,b}	0.12 ± 0.09 ^a	0.71 ± 0.05 ^b	0.47 ± 0.15 ^a	0.35 ± 0.08 ^a
	Metanólico	1.37 ± 0.57 ^b	1.36 ± 0.39 ^b	9.88 ± 1.81 ^c	0.83 ± 0.13 ^b	0.81 ± 0.22 ^b

n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; ^{a,b,c} = Indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre el solvente utilizado en la extracción con y sin hidrólisis

Previo al tratamiento de hidrólisis, en el extracto etanólico se encontraron los siguientes compuestos en orden descendente: quercetina, ácido clorogénico, miricetina, kaempferol y ácido cafeico. Por otra parte, el orden para el extracto metanólico fue: miricetina, ácido cafeico, ácido clorogénico, kaempferol y quercetina.

Después de la hidrólisis de los extractos, los compuestos presentes en mayor concentración en el extracto el etanólico fueron miricetina y ácido clorogénico; mientras que en el metanólico, fueron miricetina, ácido clorogénico y ácido cafeico.

Es importante destacar que el compuesto fenólico predominante en ambos extractos es la miricetina, sin embargo, el contenido de este compuesto después de la hidrólisis es significativamente mayor en el extracto metanólico en contraste con el extracto etanólico, variando de 9.88 a 1.2 mg/100 g, respectivamente.

El análisis de varianza determinó que tanto el tipo de solvente utilizado en la extracción, como el tratamiento de hidrólisis de los compuestos, presentaron diferencia significativa en el ácido clorogénico y miricetina. La quercetina y kaempferol no resultaron significativos al tratamiento de hidrólisis en el caso del extracto etanólico y el ácido cafeico, en ambos solventes.

6.3.1 Presencia de Compuestos No Identificados en la Determinación

El análisis cromatográfico demostró la presencia de compuestos no identificados con los estándares en ambos extractos. En las Figuras 15 y 16 se presentan los cromatogramas de la cuantificación antes y después del tratamiento de hidrólisis de los extractos etanólico y metanólico de chía, respectivamente; se indican con flechas cada uno de los compuestos.

En el extracto etanólico se encontraron dos compuestos en los minutos 5.4 y 6.2; mientras que en el extracto metanólico se encontraron tres compuestos: dos fueron los mismos que en el extracto etanólico y el tercero se encontró en el minuto 5.0.

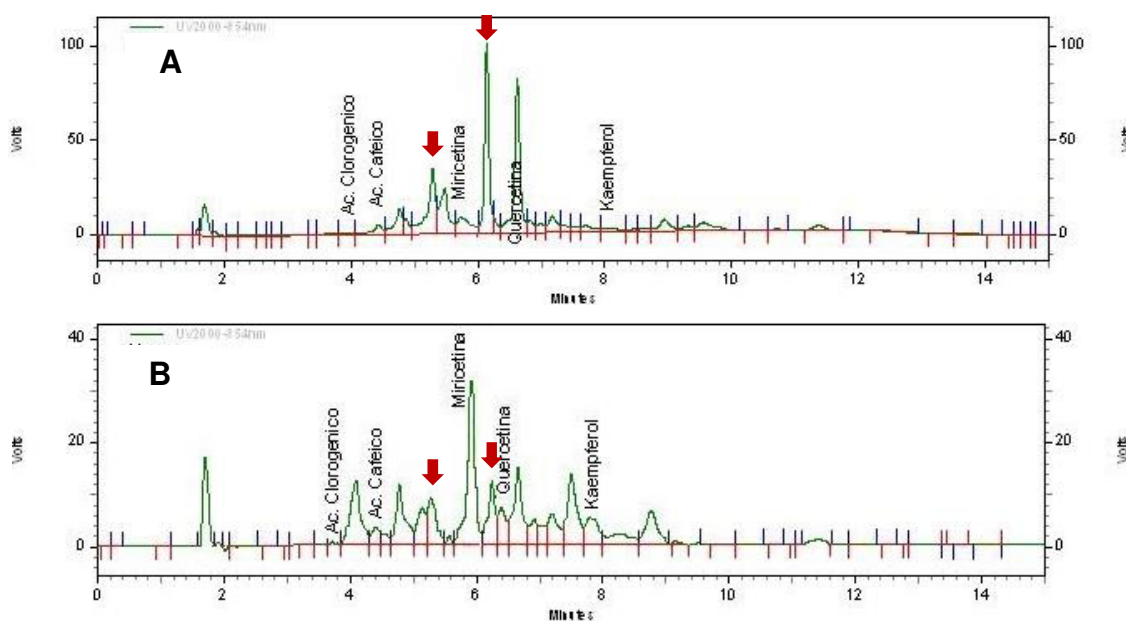


Figura 15. Resultados de los cromatogramas del extracto etanólico de chía con la presencia de compuestos no identificados (tiempo de retención a los minutos 5.4 y 6.2). A: Extracto sin hidrólisis; B: Extracto con hidrólisis.

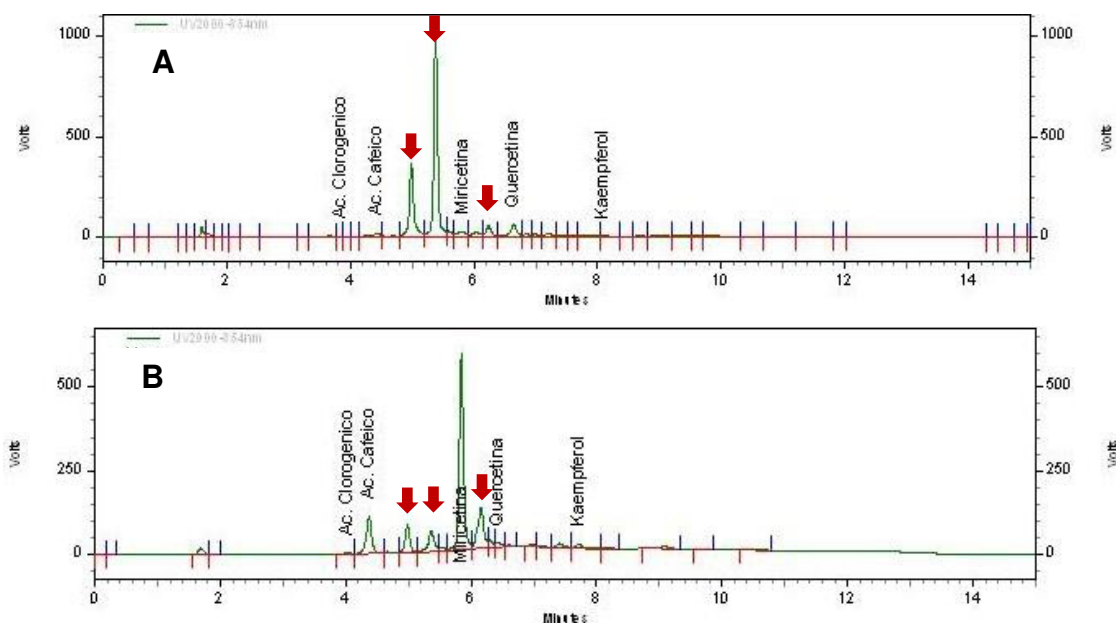


Figura 16. Resultados de los cromatogramas del extracto metanólico de chíá con la presencia de compuestos no identificados (tiempo de retención a los minutos 5.0, 5.4 y 6.2). A: Extracto sin hidrólisis; B: Extracto con hidrólisis.

6.4 Estandarización de la Técnica de Análisis de la Actividad Inhibitoria sobre la Enzima Convertidora de Angiotensina

La estandarización del método del ensayo de inhibición enzimática incluyó la obtención de curvas de calibración de los estándares de dos compuestos: ácido hipúrico (el producto de la reacción) y HHL (el sustrato de la reacción). Los datos del tiempo de retención, r^2 y la ecuación de la recta se presentan en la Tabla 6:

Tabla 6. Datos de la estandarización del método de inhibición enzimática

Estándar	Tiempo de retención (min)	r^2	Curva de calibración
Ácido hipúrico	4.967	0.999681	$9.66367e-005x + 4.36893$
Hipuril-L-histidil-L-leucina	7.890	0.999477	$9.98144e-005x - 7.01152$

En la Figura 17 se presenta el cromatograma de los dos estándares empleados para esta determinación.

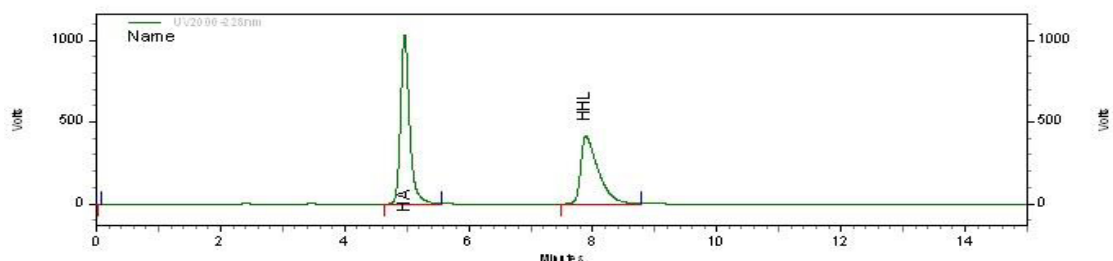


Figura 17. Cromatograma de los estándares del producto y sustrato del ensayo de inhibición enzimática. HA: Ácido hipúrico; HHL: Hipuril-L-histidil-L-leucina.

Como control positivo de la reacción se utilizó captopril, por lo que se calculó la concentración necesaria para obtener el 50 % de inhibición, obteniendo como resultado un valor de IC_{50} de 8.8 ± 1.1 nM; la gráfica y el coeficiente de determinación se presenta en la Figura 18.

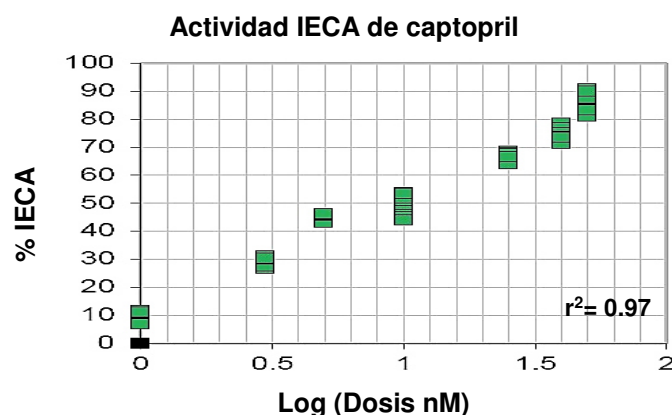


Figura 18. Actividad IECA de captopril. n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado

Previo al análisis de las muestras, se realizaron ensayos con etanol y metanol para probar la ausencia de inhibición de la enzima por causa de los solventes utilizados en el ensayo. Se probaron diferentes concentraciones dando como resultado el empleo de etanol 20 % y metanol 20 %, respectivamente, para la dilución de los extractos que fueron analizados, ya que con esta concentración de alcohol no se genera inhibición de la ECA, mientras que concentraciones superiores de alcohol, presentaban inhibición de la ECA (datos no mostrados).

6.5 Determinación de la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de extractos de semilla de chía

El ensayo de inhibición enzimática se realizó utilizando diferentes concentraciones de cada extracto (etanólico y metanólico) desde 0.001 hasta 18 mg/mL, en donde se demostró la capacidad de ambos extractos de semilla de chía para inhibir la ECA. En las Figuras 19 y 20 se presenta la gráfica del porcentaje de inhibición que ejercieron los extractos, así como el coeficiente de determinación obtenido para cada modelo.

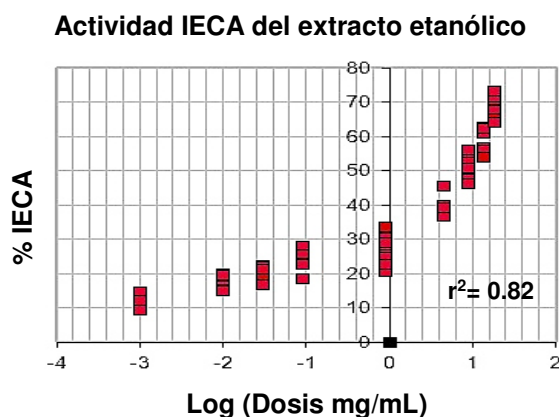


Figura 19. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto etanólico de chía. n = Tres muestras independientes analizadas por triplicado

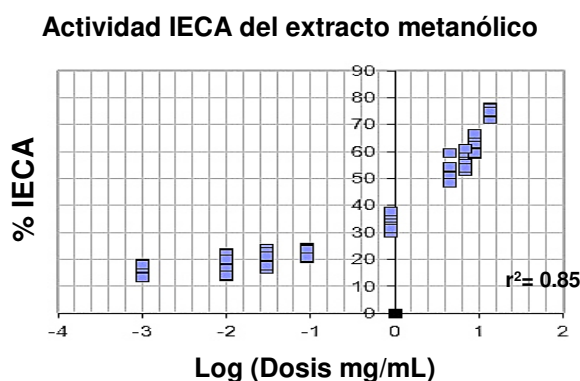


Figura 20. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina del extracto metanólico de chía. n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado

En la Tabla 7 se presentan los resultados de la actividad inhibitoria; haciendo una comparación entre las concentraciones de extracto utilizados y el porcentaje de

inhibición obtenido, se observó claramente una mayor inhibición ejercida por el extracto metanólico en contraste con el extracto etanólico, a excepción de las concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.09 mg/mL de extracto, en donde estadísticamente la inhibición no difiere entre extractos.

Tabla 7. Actividad inhibitoria de los extractos de semilla de chía

Concentración de extracto (mg/mL)	% IECA Extracto Etanólico	% IECA Extracto Metanólico
0.001	11.8 ± 1.9	15.3 ± 2.0
0.01	17.8 ± 2.0*	18.6 ± 3.0*
0.03	20.4 ± 1.8*	19.6 ± 2.5*
0.09	23.5 ± 2.5*	22.5 ± 1.5*
0.9	26.5 ± 4.0	33.5 ± 2.7
4.5	39.2 ± 2.7	53.4 ± 3.0
6.8	NA	56.1 ± 2.7
9.0	51.0 ± 2.8	62.6 ± 3.0
13.6	59.2 ± 3.4	74.4 ± 1.5
18.0	68.1 ± 3.2	NA

n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; NA= No analizado; * = Indica medias estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$) por concentración entre el solvente de extracción

El valor del IC₅₀ para cada uno de los extractos, se calculó mediante la interpolación de los valores del eje de las abscisas (x = concentración del extracto) realizando una transformación logarítmica para obtener un mejor ajuste de la pendiente en la gráfica de dosis-respuesta; los resultados se encuentran en la Tabla 8. Al hacer un comparativo entre los extractos, se observa que el extracto metanólico tiene una capacidad mayor de inhibir la ECA.

Tabla 8. Valores de IC₅₀ de los extractos de chía

Muestra	IC ₅₀
Extracto etanólico	7.1 ± 1.4 mg/mL
Extracto metanólico	2.1 ± 1.2 mg/mL

n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado

En relación a la capacidad de IECA que mostró el captopril de acuerdo al valor obtenido de IC_{50} , la dosis necesaria para ejercer el mismo efecto, equivale a 0.14 y 0.08 g de semilla de chía cuando se utiliza una extracción etanólica y metanólica, respectivamente (valores obtenidos con los datos de IC_{50} de los extractos y del rendimiento del proceso de extracción).

6.6 Separación Cromatográfica de Extractos de Semilla de Chía

La separación de los compuestos encontrados en los extractos de semilla de chía se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex LH-20 como gel de filtración. La gráfica del acondicionamiento y calibración de la columna con azul dextrano como marcador, se presenta en la Figura 21. El flujo se ajustó a 1 mL/min y el volumen de vacío (V_0) obtenido fue de 60 mL en promedio para ambos solventes de elución.

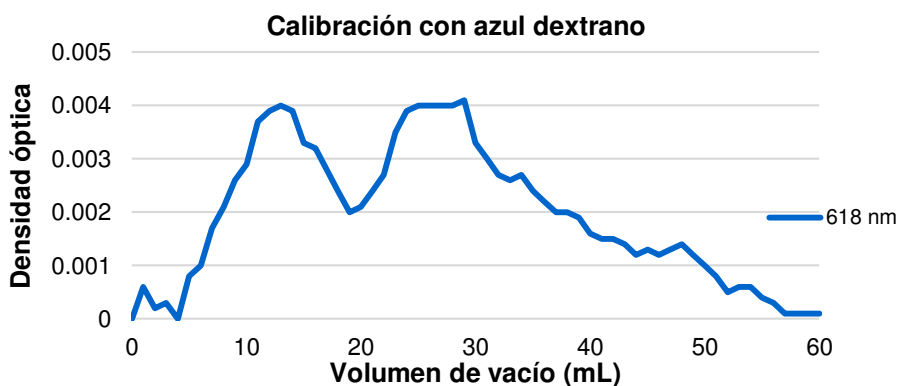


Figura 21. Calibración de la columna utilizando azul dextrano. n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado

La separación cromatográfica de los dos extractos alcohólicos presentó cinco fragmentos en altas concentraciones según el análisis espectrofotométrico a 280 nm, esta longitud de onda permite medir la banda II (250 – 285 nm) correspondiente al anillo A de la estructura química del esqueleto de los flavonoides (Figura 6). Por otra parte, en la lectura a 354 nm, la cual cuantifica la banda I (320 – 385 nm) correspondiente al anillo B de la estructura, sólo se observó una

fracción del extracto metanólico en altas concentraciones, coincidente con la última fracción a 280 nm (Figura 22 y 23).

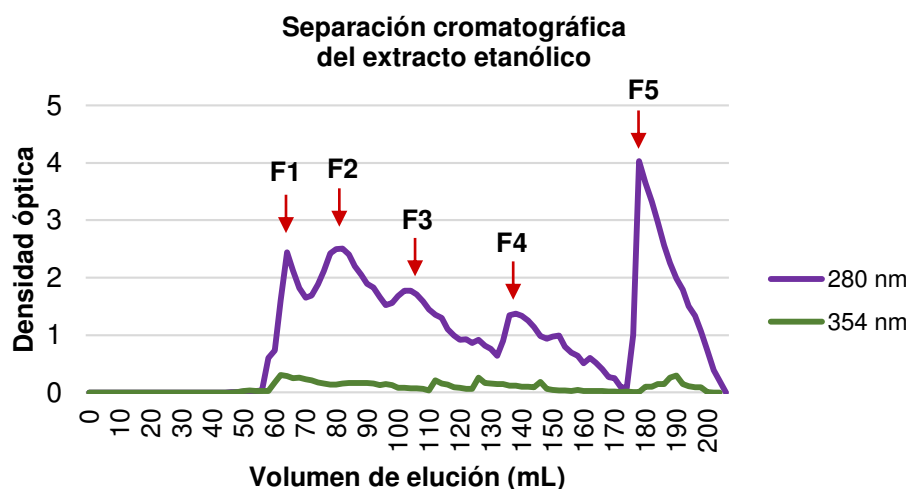


Figura 22. Resultados de la separación cromatográfica del extracto etanólico de semilla de chía.
n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; F=Fracciones

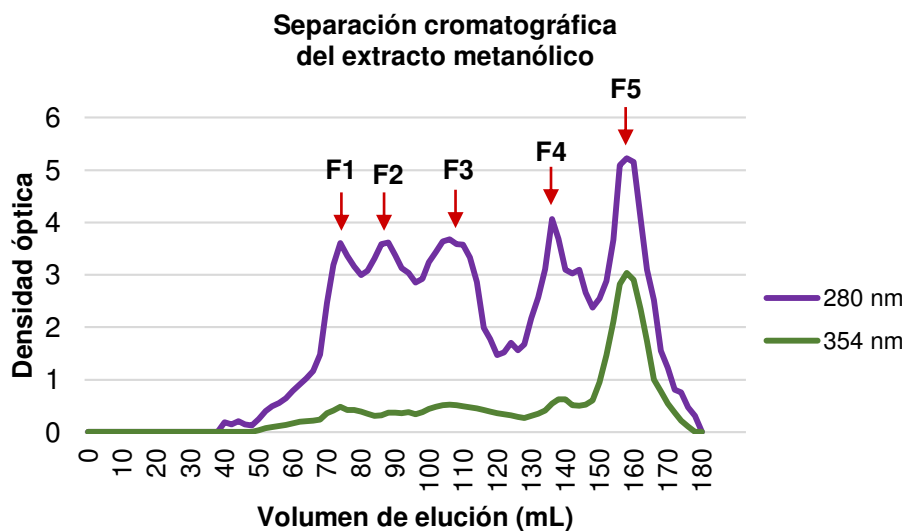


Figura 23. Resultados de la separación cromatográfica del extracto metanólico de semilla de chía.
n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; F=Fracciones

El volumen total de la columna fue de 200 mL para el extracto etanólico y de 180 mL para el extracto metanólico.

6.7 Selección y Tratamiento de las Fracciones

Se obtuvieron 70 fracciones de 2 mL cada una en la separación del extracto etanólico y 60 en la del extracto metanólico. De acuerdo al análisis espectrofotométrico presentado previamente, se seleccionaron aquellas fracciones que presentaron las absorbancias más altas para cada uno de los extractos (las flechas de las Figuras 22 y 23 indican cada una de las cinco fracciones).

A partir de esta selección, se realizaron los cálculos para obtener el valor de K_{av} de cada una de las fracciones. En las fracciones (F1 – F5) del extracto etanólico, los valores fueron: 0.03, 0.16, 0.30, 0.56 y 0.84, respectivamente; mientras que en el extracto metanólico fueron: 0.10, 0.23, 0.38, 0.63 y 0.82.

Estas fracciones fueron utilizadas para realizar la determinación de la actividad IECA, así como para el análisis de la identificación de los compuestos fenólicos presentes.

6.8 Identificación de los Compuestos presentes en las Fracciones

Se realizó un análisis mediante HPLC para identificar los compuestos presentes en las fracciones de los extractos, los cuales se presentan en la Tabla 9.

Debido a que la mayoría de las concentraciones de los compuestos se encontraron por debajo de los límites de cuantificación, se realizó un análisis cualitativo para la identificación de los compuestos fenólicos.

Tabla 9. Compuestos encontrados en las fracciones de extractos de semilla de chía

Extracto etanólico	Sin hidrólisis	Con hidrólisis	Extracto metanólico	Sin hidrólisis	Con hidrólisis
F1	CNI d	CNI d	F1	CNI d	Kaempferol
	CNI e	CNI g		CNI e	Miricetina
				Ac. clorogénico	CNI i
					CNI d
F2	CNI d	CNI d	F2	CNI b	CNI d
	CNI e	Quercetina		CNI d	Ac. cafeico
				CNI e	Kaempferol
				CNI j	
F3	CNI h	Quercetina	F3	Miricetina	CNI d
	CNI f	Kaempferol		CNI d	Quercetina
	CNI d	CNI f		Quercetina	Kaempferol
	CNI e	CNI d		CNI c	Miricetina
				Kaempferol	
F4	CNI d	CNI d	F4	CNI b	CNI d
	Miricetina	Miricetina		Ac. cafeico	Ac. cafeico
F5	CNI b		F5	CNI b	CNI d
	Quercetina	Miricetina		CNI a	Ac cafeico
	CNI d	Quercetina		Ac. cafeico	Miricetina
	Ac. cafeico	CNI d		Miricetina	Quercetina
	CNI e	Ac. cafeico			
	CNI a			Quercetina	

CNI= Compuesto no identificado (sin estándar): a) min 5.0; b) min 5.4; c) min 5.8; d) min 6.2; e) min 7.0; f) min 8.8; g) min 9.4; h) min 10.5; i) min 11.0; j) min 12.5; Los compuestos presentan en orden descendente según el área bajo la curva registrada en el análisis de HPLC.

En las fracciones seleccionadas del extracto etanólico se observó que, de los cinco compuestos fenólicos analizados en este trabajo, solamente fueron

identificados los compuestos miricetina (fracción 4), quercetina y ácido cafeico (fracción 5). Sin embargo, después del tratamiento de hidrólisis, se liberaron las agliconas de quercetina, miricetina y kaempferol. Además, se encontraron compuestos no identificados con tiempos de retención en los minutos 5.0 (fracción 5); 5.4 (fracción 5); 6.2 (todas las fracciones); 7.0 (fracción 1, 2, 3 y 5); 8.8 y 10.5 (fracción 3).

Por otra parte, en las fracciones analizadas del extracto metanólico antes de la hidrólisis, se encontraron las agliconas de los cinco compuestos: ácido clorogénico (fracción 1), ácido cafeico (fracción 4 y 5); miricetina (fracción 3 y 5); quercetina (fracción 3 y 5) y kaempferol (fracción 3). Además, se encontraron compuestos no identificados a los minutos 5.0 (fracción 5); 5.4 (fracción 2, 4 y 5); 5.8 (fracción 3); 6.2 (fracción 1, 2 y 3); 7.0 (fracción 1 y 2) y 12.5 (fracción 2). De igual forma como en el extracto etanólico, tras la hidrólisis, se liberaron las agliconas de los glicósidos de miricetina, kaempferol y ácido cafeico.

Es posible que los compuestos no elucidados sean otros flavonoles, o quizá compuestos fenólicos del grupo de las flavonas, ya sea en forma libre o conjugada con azúcares u otros compuestos.

6.9 Determinación de la Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina de las Fracciones

La actividad inhibitoria de las fracciones seleccionadas fue determinada ajustando cada una de ellas a una concentración final de 0.03 mg/mL.

En la siguiente figura se presenta el porcentaje de inhibición que ejercieron las fracciones de cada extracto (Figura 24), en donde se observó que todas presentaron una inhibición sobre la ECA en un rango de 5 a 34 %.

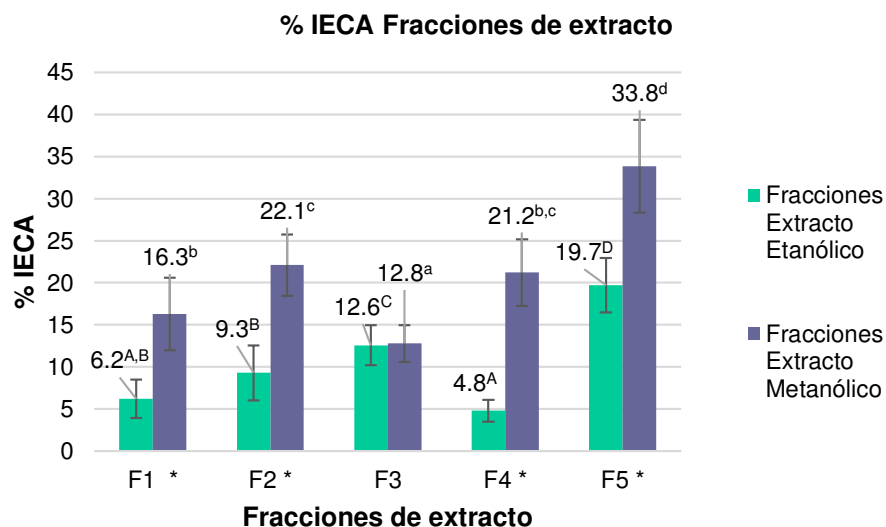


Figura 24. Actividad inhibitoria de las fracciones de extractos de semilla de chía a una concentración de 0.03 mg/mL. n= Tres muestras independientes analizadas por triplicado; * = Indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en el % IECA de las fracciones al comparar los extractos; ^{A,B,C,D} = Indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre las fracciones del extracto etanólico; ^{a,b,c,d} = Indica diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre las fracciones del extracto metanólico.

El análisis de la determinación demostró que todas las fracciones, excepto la fracción 3, presentaron diferencia significativa entre los extractos, observando que la mayoría de las fracciones del metanólico tuvieron una actividad inhibitoria mayor; de igual forma se encontró que la fracción 5 en ambos solventes presentó la mayor IECA con respecto a las demás fracciones.

Los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis en donde se describe que las fracciones semipurificadas de los extractos de semilla de chía, poseen mayor actividad IECA que los extractos crudos, ya que las fracciones 2, 4 y 5 del extracto metanólico, presentan valores superiores que el extracto crudo, en especial la fracción 5, la cual es un 72.5 % superior.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Características de los extractos de semilla de chía

Los extractos analizados en este trabajo partieron de la obtención de harina de semilla de chía empleando hexano como solvente de arrastre de la fase lipofílica. Este proceso previo permitió la eliminación de más de la tercera parte del peso de la semilla ($36.2 \pm 1.9 \%$).

Los estudios en donde se han analizado las características de composición química y nutricional de la chía, reportan valores de grasa en un rango muy amplio, que va desde 21 hasta 36 % en semilla cultivada en distintas zonas de México: Chiapas, Oaxaca, Michoacán y Puebla: 23.7, 22.3, 21.5 y 32.7 %, respectivamente (Porrás-Loaiza, Jiménez-Munguía, Sosa-Morales, Palou y López-Malo, 2013), América Central y Sur: Guatemala y Argentina: 25 y 32 %, respectivamente (Ixtaina, 2010); Ecuador: 25.8 - 27.2 % (Ayerza y Coates, 2009); Brasil: 32.4 % (Silveira y Salas-Mellado, 2014), 35.8 % (Silva, García y Zanette, 2016); Sur de Brasil: 21.7 % (Sargi et al., 2013); Chile: 30.2 % (Da Silva et al., 2014).

Las diferencias en el contenido de nutrientes y fitoquímicos de la semilla están estrechamente relacionadas con la interacción de distintos factores que van desde la zona geográfica, la temperatura, la estacionalidad, el genotipo de la semilla, las prácticas agronómicas, el efecto ante los factores ambientales, entre otros. Específicamente en el caso de la grasa, se ha demostrado que la temperatura es el factor que ejerce mayor efecto: a menor temperatura, mayor contenido de aceite (Yaniv, Schafferman y Zur, 1995; Ayerza y Coates, 2009).

Este estudio demostró un valor promedio similar al límite superior del rango reportado por otros autores en diferentes estados de México y de otros países del continente americano, por lo que se demuestran las variaciones ambientales en el cultivo, así como la posible estacionalidad del año en el momento de la cosecha.

Enseguida del desgrasado, se obtuvieron dos extractos utilizando solventes orgánicos con polaridades similares: etanol y metanol (siendo el último de ellos el de mayor polaridad).

La extracción es el primer paso en el análisis de plantas ya que es necesario extraer los componentes químicos deseados a partir del material vegetal para su posterior separación y caracterización. Esta técnica utiliza el principio de la polaridad para realizar la separación selectiva de uno o más compuestos o para purificar un compuesto determinado. El objetivo de este proceso es obtener el máximo rendimiento de las sustancias de interés (Guarnizo, 2012).

La capacidad de extracción depende de diversos factores, entre los que se encuentran: el método y tiempo de extracción, el tipo de disolvente, la naturaleza y preparación del material a extraer, el tamaño de las partículas sólidas, la estructura química de los compuestos, la temperatura, la agitación, la relación sólido-líquido y la posible presencia de sustancias de interferencia (Gómez y Salím, 2006; Wang y Weller, 2006; Bucić-Kojić et al., 2011).

En el presente estudio se observó que el extracto etanólico obtuvo un rendimiento 50 % mayor que el metanólico ($p < 0.05$); estos resultados pudieran ser explicados debido a que la metodología empleada en la remoción de la fase grasa, utilizando hexano 1:8 (p/v), no retiró la totalidad de la fase lipofílica de la semilla; por lo que esto permitió la extracción de otros compuestos de naturaleza menos polar que pudieron ser arrastrados por el solvente. Estudios previos en la semilla, han reportado la existencia de compuestos no polares como esteroides, terpenos e insaturaciones en extractos etanólicos de chía, utilizando técnicas cualitativas de análisis fitoquímico (González, 2012; López y Ortega, 2014).

El resultado del rendimiento obtenido de los extractos siguió la misma tendencia que los reportes de López y Ortega (2014) en extractos etanólico y metanólico sin desgrasar, en donde el etanólico obtuvo un porcentaje mayor que el metanólico.

Algunos estudios del contenido de compuestos fenólicos en materia vegetal, han demostrado que el rendimiento de la extracción de estos compuestos es dependiente del tipo de disolvente empleado, condición asociada a la polaridad del solvente y a los compuestos presentes (Rosales y González, 2003; Lapornik, Prosek y Wondra, 2005; Pérez-Nájera, Lugo-Cervantes, Gutiérrez-Lomelí y Del Toro-Sánchez, 2013; Muñoz et al., 2015).

7.2 Cuantificación de Compuestos Fenólicos de Extractos de Semilla de Chía

La cuantificación de los principales compuestos fenólicos en la semilla de chía fue realizada utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual es una de las técnicas más empleadas para este fin de acuerdo con distintos autores, debido a que es un método sensible y específico; además permite la separación de compuestos estructuralmente similares (Tsuda, 2004; Plazonić et al., 2009; Sasidharan, Chen, Saravanan, Sudram y Yoga, 2011).

El extracto metanólico fue el que presentó la mayor cantidad de compuestos fenólicos, específicamente en forma de glicósido, lo cual es debido a que son moléculas polares que son más afines al solvente (Pérez-Nájera et al., 2013).

En diversos estudios de extractos de semilla de chía (Taga et al., 1984; Reyes-Caudillo et al., 2008; Ayerza y Coates, 2009; Ixtaina, 2010; Ayerza, 2013; Silveira y Salas-Mellado, 2014) se han reportado las concentraciones de cinco principales compuestos fenólicos: ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol, observando variaciones, que son dependientes de la zona geográfica del cultivo, las condiciones climáticas y ambientales y la temporada del año de la siembra.

En esta investigación, la concentración de los compuestos se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos por Ixtaina (2010) en el análisis de semillas provenientes de Salta, Argentina; en donde el orden descendente

reportado fue: miricetina, ácidos clorogénico y cafeico, seguido de trazas de kaempferol y quercetina.

La miricetina fue el compuesto que se encontró en mayor concentración en una tasa de 16.5:1 en relación con quercetina; esta característica es similar a los reportes de Taga et al. (1984), en donde se afirma que este flavonol con capacidad antioxidante, fue el principal compuesto encontrado en los extractos de chíá con una relación de 16:1. Mientras que, en otros estudios la proporción es mayor (19.8:1) y el compuesto mayoritario es el ácido clorogénico (Ayerza, 2013).

La mayor cantidad de compuestos fenólicos se encontró en forma de glicósido, específicamente los de miricetina, ya que posterior al tratamiento de hidrólisis, se liberan los azúcares de las agliconas y estas últimas fueron cuantificadas por el método descrito previamente. Caso similar ocurrió en los reportes de Reyes-Caudillo et al. (2008) y Taga et al. (1984), en donde cuantificaron los compuestos antes y después de hidrolizarlos para conocer la proporción de flavonoides libres y conjugados.

El análisis cromatográfico demostró la presencia de tres compuestos no identificados por los estándares utilizados en la metodología. De acuerdo con el cromatograma presentado por Wang et al. (2011) en una investigación con metodología similar a la utilizada en este trabajo (columna y fase móvil), se plantea la posibilidad de que los compuestos no identificados en los minutos 5.0, 5.4 y 6.2 pudieran tratarse de flavonoides conjugados de miricetina y luteolina.

La presencia de la flavona luteolina y sus derivados ha sido reportada en extractos de la parte aérea de diferentes especies de *Salvia* (Lu y Foo, 2002), principalmente en hojas; no se encontraron reportes de la presencia de este compuesto en frutos o semillas; un resumen de esta información se encuentra en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido de luteolina y sus derivados en partes aéreas de distintas especies de Salvia

Autor	Especie de Salvia	Forma de identificación de la luteolina
Brieskorn y Biechele, 1971	<i>S. officinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona •6-metoxi luteolina •6-hidroxi luteolina •6-metoxi luteolin-7- metil-eter •Luteolin-7-metil-eter
Ulubelen, Miski, Neuman y Mabry, 1979	<i>S. tomentosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> •6-metoxi luteolin-7-glucósido
Miura, Kikuzaki y Nakatani, 2002	<i>S. officinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona •7-O-metil-luteolina
Dent et al., 2013	<i>S. officinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •6-hidroxi luteolin-7-glucósido •Luteolin-7-glucurónido •Luteolin-7- glucósido •Luteolin-3- glucurónido
Velickovic, Nikolova, Ivancheva, Stojanovic y Veljkovic, 2007	<i>S. officinalis</i> , <i>S. glutiosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona •6-hidroxi-luteolin-6-metil-eter
Generalic et al., 2012	<i>S. officinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona
Coisin et al. 2012	<i>S. aethopis</i> , <i>S. glutiosa</i> , <i>S. nemorosa</i> , <i>S. nutans</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. ringens</i> <i>S. pratensis</i> , <i>S. verticillata</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona •Luteolin-7-O-glucósido
Hamrouni-Sellami, Rahali, Rebey, Bourgou, Limam, Marzouk, 2013	<i>S. officinalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Aglicona
Amato et al., 2015	<i>S. hispanica</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Orientina (luteolin-8-C-glucósido •Luteolin-7-O-glucósido •Luteolin-O-glucurónido •Luteolin-O-hexosa

Además, el estudio *in vitro* de Gorzalczany, Moscatelli y Ferraro (2013) en un modelo de anillos aórticos aislados de rata, reveló que el extracto acuoso de *Artemisia copa* que contiene ácido *p*-cumárico, luteolina y crisoeriol

(3'-metoxiluteolina), posee un efecto vasorelajador e hipotensor a través de la inhibición del flujo de Ca^{2+} por la vía de los canales de calcio membranosos y almacenes intracelulares.

7.3 Actividad Inhibitoria de la ECA de Extractos de Semilla de Chía

El ensayo enzimático fue contrastado contra captopril como control positivo, el cual es un fármaco con potente actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina; presentó un valor de IC_{50} de 8.8 nM, que se encuentra en concordancia con el rango que ha sido reportado por otros autores (8 – 34 nM) (Hooper y Turner, 1987; Sentandreu y Toldrá, 2006; Rufián-Henares y Morales, 2007).

La determinación de la actividad IECA ha sido evaluada en plantas como *Musanga cecropioides*, *Crataegus* (espino blanco), *Cecropia hololeuca*, *Cecropia pachystachia*, *Cecropia glaziovii*, *Olea europea* (olivo), *Hibiscus sabdariffa* (jamaica), *Vaccinium ashei reade* (mora azul), algunas de ellas investigadas debido al uso medicinal empleado por antiguas civilizaciones; cabe destacar que no todas ellas son consideradas plantas habitualmente consumidas como alimentos. Se ha reportado que los extractos obtenidos de las distintas partes de las plantas previamente mencionadas (tallos, raíces, hojas, frutos) presentan un efecto inhibitorio de la ECA (Lacaille-Dubois et al., 2001; Loizzo et al., 2007; Ojeda et al., 2010; Sakaida et al., 2007).

De acuerdo al criterio establecido por Elbl y Wagner (1990), quienes proponen una concentración final de extracto de plantas de 0.33 mg/mL para evaluar actividad IECA, el porcentaje de inhibición de la ECA de los extractos de este trabajo, fue menor a los obtenidos por otros autores (Afonso et al., 2013; Simaratanamongkol et al., 2014; Guo et al., 2015).

Los valores inferiores obtenidos en esta investigación, pueden ser explicados debido a las variaciones en los métodos de extracción (métodos específicos para compuestos fenólicos), así como a la presencia de otros metabolitos que son afines al solvente y que pueden estar formando parte del extracto.

Con relación a otras especies del género salvia, Jiménez-Ferrer, Badillo, González-Cortázar, Tortoriello y Herrera-Ruiz (2010) evaluaron el efecto que ejerce el extracto hidroalcohólico (etanol 60 %) de la parte aérea (flores, hojas y tallos) de *Salvia elegans* sobre la ECA, y encontraron una inhibición del 50 % a una concentración de 2.7 mg/mL, actividad IECA similar a la obtenida por el extracto metanólico de *Salvia hispanica* en esta investigación. Se sugiere que estos resultados están relacionados a la metodología empleada, ya que se ha establecido previamente que las extracciones hidroalcohólicas o con sistemas binarios de solventes, han sido más eficientes para la obtención de compuestos fenólicos (Dent et al., 2013; Pérez-Nájera et al., 2013).

Diversos autores han aislado péptidos de *Salvia hispanica* con actividad de inhibición de ECA. Este estudio presenta una actividad IECA no relacionada con los compuestos proteicos de chíá, siendo confirmado mediante la determinación de nitrógeno por método de Dumas (datos no mostrados). La ausencia de nitrógeno sugiere que la actividad IECA de los extractos del presente estudio, es atribuida a compuestos de otra naturaleza (Salazar-Vega, Segura-Campos, Chel-Guerrero y Betancur-Ancona, 2012; Orón-Tamayo et al., 2015).

7.4 Separación Cromatográfica y Semipurificación de Extractos de Semilla de Chíá

Debido al hecho de que los extractos de plantas usualmente contienen una combinación de varios tipos de sustancias o fitoquímicos con polaridades distintas, su separación representa un reto para el proceso de identificación y caracterización de los compuestos bioactivos (Tsuda, 2004; Sasidharan et al., 2011).

Algunos autores estipulan que el empleo de diversas técnicas de separación como cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y HPLC, permiten la obtención de compuestos puros para su posterior análisis estructural y de actividad biológica. Entre ellas, una de las de mayor aplicabilidad es la cromatografía en columna de filtración en gel, también llamada de exclusión molecular, en ella se separan moléculas en virtud de sus diferencias de tamaño (Tsuda, 2004).

En el presente trabajo, la separación se realizó con el fin de fraccionar los extractos e identificar los compuestos a los que se les puede atribuir la mayor actividad inhibitoria de la ECA, para ello, se utilizó el gel Sephadex LH-20 como medio para la fase estacionaria.

Dicho gel sirve para separar compuestos que se encuentran en mezclas y/o extractos de productos naturales, específicamente de estructura polifenólica. Está compuesto por una red tridimensional de cadenas de polisacárido de dextrano modificado mediante hidroxipropilación que posee propiedades lipofílicas e hidrofílicas, las cuales posibilitan su solvatación en agua, solventes orgánicos polares y mezclas de solventes orgánicos polares y no polares, permitiendo la separación de moléculas de acuerdo a su peso molecular, en donde los compuestos de mayor tamaño migran primero (Murphy y Diez, 1975). De esta forma, se eligieron como solventes de extracción etanol y metanol para cada extracto, respectivamente.

La gráfica del espectro del análisis de las fracciones (Figuras 21 y 22) coincide con el patrón obtenido en la cuantificación de los compuestos fenólicos, ya que en el extracto metanólico se obtuvieron valores de absorbancia mayores que en el etanólico (valores de densidad óptica de hasta 5.3 *versus* 4.0), haciendo referencia a que se encontró una cantidad mayor de compuestos en el extracto metanólico.

A su vez, este mismo análisis de las fracciones seleccionadas mostró altos valores de absorbancia a 280 nm, lo cual sugiere la presencia de derivados de

benceno, entre los que se encuentran los compuestos de naturaleza fenólica (hidroxibencenos) (Kumar y Pandey, 2013).

En la naturaleza, los polifenoles se encuentran unidos a otros compuestos como metilos, ácidos orgánicos y azúcares, en diferentes posiciones de la molécula, siendo estos últimos los más abundantes, específicamente *O*-glicósidos. El azúcar puede ser mono-, di-, tri-, o de manera menos frecuente, glicósidos de alto nivel como oilgo- y polisacáridos (Bohm, 1998).

Otros autores han reportado la separación de compuestos fenólicos de extractos hasta un nivel más puro, sin embargo, la metodología contempla técnicas de cromatografía más complejas para aislar las moléculas (algunas de ellas, el empleo de varios procesos de fraccionamiento), así como sistemas compuestos de solventes de elución. Además, la elucidación se ha llevado a cabo mediante métodos más específicos como la resonancia magnética nuclear (RNM) o el HPLC ligado a masas (Jiménez-Ferrer et al., 2010; Simaratanamongkol et al., 2014; Guo et al., 2015).

7.5 Identificación de los Compuestos presentes en las Fracciones

El análisis mediante HPLC demostró que los principales compuestos fenólicos analizados fueron encontrados en la fracción 5 con hidrólisis de ambos extractos. El peso molecular de los compuestos es un indicador para la identificación, debido a que la técnica de cromatografía con Sephadex, separa las moléculas de acuerdo a su tamaño, en donde las moléculas más grandes migran primero. En orden descendente, el peso molecular de las agliconas de los compuestos fenólicos es: ácido clorogénico (354.31 g/mol), miricetina (318.24 g/mol), quercetina (302.24 g/mol), kaempferol (286.23 g/mol) y ácido cafeico (180.16 g/mol). Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, la mayor cantidad de los compuestos fenólicos se encuentran en forma de glicósidos (73 y 50 % en extracto metanólico y etanólico, respectivamente).

Este orden de migración se pudo observar en los ácidos hidroxicinámicos; en donde el ácido clorogénico solo fue encontrado en la primera fracción metanólica y el ácido cafeico, eluyó principalmente en las últimas dos fracciones (F4 y F5). Caso contrario se observó en las agliconas de los flavonoides (miricetina, quercetina y kaempferol), ya que no siguieron el orden esperado de migración, pudiendo deberse a que el peso molecular entre ellos, es muy similar.

La diversidad en el grupo de los compuestos fenólicos, es uno de los factores más importantes que hace que su análisis sea tan complejo. Además, algunos de ellos se encuentran unidos a hidratos de carbono y proteínas, por lo que es necesario llevar a cabo una hidrólisis previa a la extracción para romper estos enlaces (éter, éster, acetal), especialmente si se desconoce la estructura del glicósido fenólico o si los estándares apropiados no se encuentran disponibles de manera comercial (Viñas y Campillo, 2014).

Es importante destacar, que en la fracción 5 del extracto metanólico se detectó la presencia del compuesto no identificado (CNI) b con un tiempo de retención en el minuto 5.4 en alta concentración, el cual disminuyó después del tratamiento de hidrólisis, observándose, además, un aumento del CNI d en el minuto 6.2 (Figura 25).

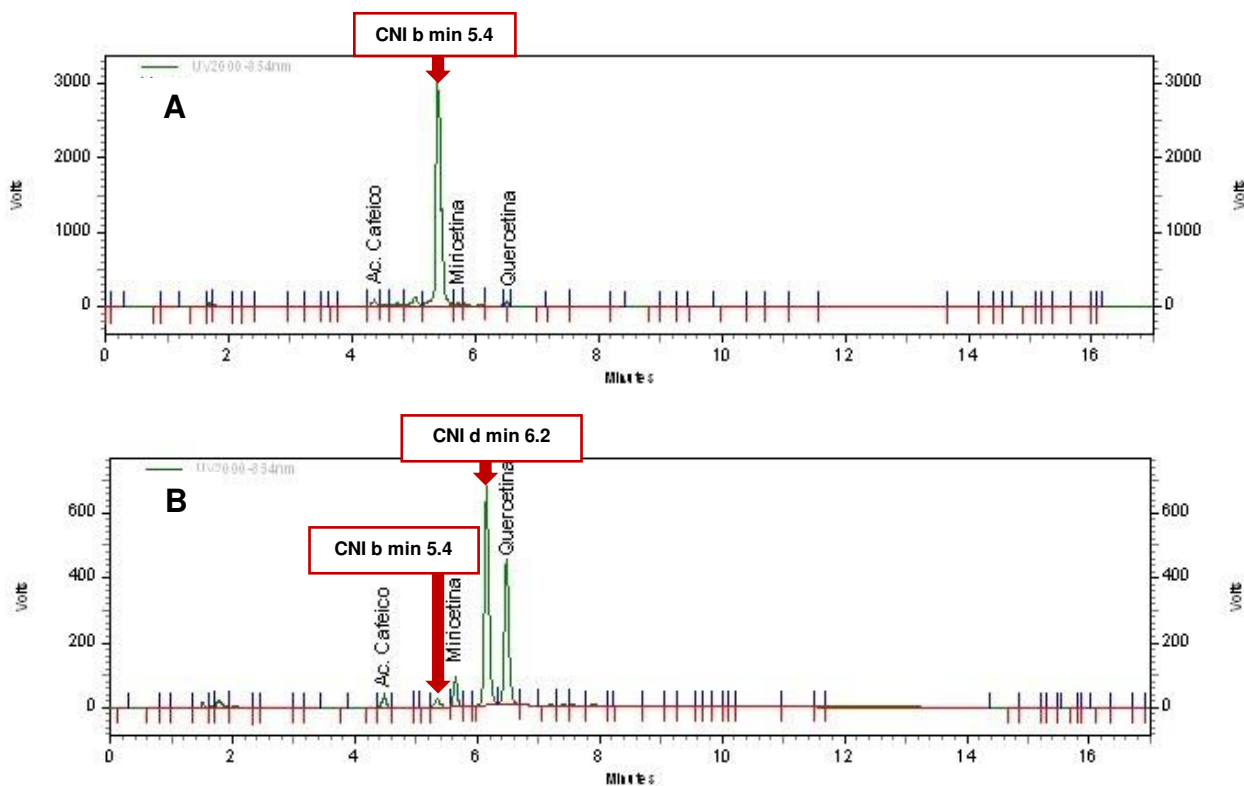


Figura 25. Resultados de los compuestos no identificados en la fracción 5 del extracto metanólico. A: Fracción sin hidrólisis; B: Fracción con hidrólisis.

El comportamiento del CNI b (min 5.4), sugiere que se trata de un compuesto conjugado y su aglicona correspondiente, efecto similar mostrado en el aumento de quercetina tras la hidrólisis. Una revisión en la literatura (Wang et al., 2011) plantea la posibilidad que el CNI d podría tratarse de luteolina al comparar el cromatograma presentado en una investigación con metodología similar a la del presente estudio, el cual eluyó entre los estándares de miricetina y quercetina después de sus respectivos glicósidos, lo cual plantea la posibilidad de que el compuesto CNI b, puede tratarse de algún derivado de luteolina.

7.6 Actividad Inhibitoria de la ECA de las Fracciones de Extractos de Semilla de Chía

El ensayo enzimático demostró que algunas fracciones ejercieron una actividad inhibitoria de ECA mayor a la alcanzada por los extractos completos a la misma concentración (0.03 mg/mL), lo cual sugiere que, al lograr un grado de semipurificación, se optimizó la capacidad de los compuestos responsables que ejercieron la actividad IECA.

En dicha actividad inhibitoria de la ECA, se observó que, en la mayoría de las fracciones, se encontró la presencia de glicósidos de los principales compuestos fenólicos analizados, ya que, al aplicar el tratamiento de hidrólisis, las agliconas de estos compuestos pudieron ser identificadas. Esto sugiere, que, en mayor medida, los compuestos responsables de este efecto fueron los glicósidos de los polifenoles (al realizar la prueba de inhibición de las fracciones sin hidrolizar), caso coincidente fue reportado en otros estudios, en donde los autores refirieron haber encontrado actividad inhibitoria superior en compuestos glicósidos (Balasuriya y Rupasinghe, 2012; Simaratanamongkol et al. 2014).

La mayor actividad de IECA fue encontrada en la fracción 5 de ambos extractos. De acuerdo con la identificación de los compuestos, la fracción etanólica contenía ácido cafeico y quercetina, mientras que la metanólica contenía mayor concentración de las mismas a la que se sumó la presencia de miricetina. Es importante recordar la presencia de los CNI b y d (probablemente luteolina y sus derivados), los cuales se encontraron en mayor concentración en estas fracciones, específicamente en el extracto metanólico.

Al realizar una comparativa entre los compuestos identificados y el % IECA presente en las fracciones, se pudo observar que las fracciones con IECA superior al 19 % contenían el CNI b y ácido cafeico, en la fracción 5 del extracto etanólico y en las fracciones 2, 4 y 5 del metanólico. Esto pudiera explicar la mayor actividad IECA que presenta el extracto metanólico con respecto al etanólico.

Otro efecto observado en el ensayo enzimático y la identificación de fracciones, es el aumento de la actividad inhibitoria de ECA frente a la presencia de distintos compuestos (CNI b, CNI d, ácido cafeico, miricetina y quercetina) que en comparación a su ausencia disminuye su efecto IECA de manera significativa. Se infiere que dicho comportamiento se debe a la concentración y la relación que se guarda entre los compuestos antes mencionados, quizá también a un efecto sinérgico entre los compuestos. Estas observaciones han sido reportadas por Simaratanamongkol et al. (2014), en donde se evaluó el efecto IECA de compuestos fenólicos aislados de extracto metanólico de apio, duplicando el efecto inhibitorio al aumentar la concentración del compuesto con mayor actividad y al combinar con 6 compuestos adicionales (glicósidos de flavonoides) de menor IECA.

El efecto inhibitorio adjudicado a los compuestos fenólicos ha sido explicado de manera teórica mediante el análisis de relación estructura-actividad (QSAR: Quantitative Structure Activity Relationship), el cual ha revelado el incremento en la actividad IECA por la combinación de sub-estructuras en el esqueleto de los flavonoides.

Estos incluyen los siguientes elementos en orden de importancia: (a) doble enlace entre C2 y C3 en el anillo C (su ausencia disminuye un 91 % la actividad) (b) 4'-O-metoxilación en el anillo B (su presencia disminuye un 78 % la actividad), (c) el grupo carbonilo en C4 del anillo C (su ausencia disminuye un 74 % la actividad), (d) número de grupos hidroxilo (su presencia aumenta un 57 % la actividad), (e) 3-O-glicosilación (su presencia disminuye un 36 % la actividad) (Guerrero et al., 2012).

De acuerdo con lo anterior, el doble enlace entre C2 y C3 en el anillo C, se encuentra de manera general en las flavonas, isoflavonas y flavonoles. La flavona luteolina fue el compuesto que demostró la mayor inhibición de la ECA a 100 μ M al cumplir con la mayoría de los rasgos estructurales de este estudio, seguida por los flavonoles kaempferol y rutina (quercetina-3-O-ramnoglucósido), la flavona roifolina

(apigenina 7-*O*-neohesperidosida) y el flavonol quercetina, con 57.3, 37.7, 36.8, 33.5 y 32.0 %, respectivamente.

Por otra parte, en el estudio de acoplamiento molecular realizado por Al Shukor et al. (2013), en donde se analizaron 22 compuestos fenólicos puros y su respectiva actividad IECA, se observó una estrecha relación entre el grupo acrílico del ácido cafeico y los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la ECA, en donde se presentaron interacciones moleculares: carga-carga, puentes de hidrogeno y enlaces Pi. Dicha actividad del ácido cafeico, también podría dar explicación a los resultados obtenidos en los extractos y fracciones evaluados en el presente estudio.

Por todo lo anterior, se sugiere que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de semilla de chía, principalmente los polifenoles en forma conjugada, son los responsables del efecto inhibitorio sobre la enzima convertidora de angiotensina, siendo dicho efecto, directamente proporcional a su concentración.

VIII. CONCLUSIONES

1. El extracto metanólico presentó menor rendimiento, pero mayor concentración de compuestos fenólicos.
2. La mayoría de los compuestos fenólicos que se encontró fueron en forma de glicósido en ambos extractos y la miricetina fue el compuesto identificado con mayor concentración, llegando a una relación de 16.5:1, con respecto a la quercetina.
3. La cromatografía en columna logró semipurificar los compuestos fenólicos de los extractos de semilla de chía en cinco fracciones.
4. Los extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) de semilla de chía y sus respectivas fracciones, demostraron tener actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en diferente grado, siendo el metanólico el de mayor eficiencia.
5. La inhibición de la ECA que ejerce el captopril es equivalente a 0.14 y 0.08 g de semilla de chía cuando los compuestos bioactivos se extraen con etanol y metanol, respectivamente.
6. Las fracciones 2, 4 y 5 del extracto metanólico presentaron mayor eficiencia inhibitoria sobre la ECA que el extracto crudo.
7. Se encontraron compuestos fenólicos en ambos extractos que no pudieron ser identificados con los estándares que se usaron en este trabajo.
8. Las fracciones de ambos extractos con mayor actividad IECA presentaron la concentración más alta de ácido cafeico.
9. Los compuestos fenólicos semipurificados detectados en los extractos de semilla de chía con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, tienen potencial para ser utilizados en el desarrollo de agentes coadyuvantes en el tratamiento antihipertensivo, con la ventaja de ser derivados de una matriz alimentaria.

IX. FUENTES DE CONSULTA

- Actis-Goretti, L., Ottaviani, J., Keen, C. y Fraga, C. (2003). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Letters*, 555, 597-600.
- Afonso, J., Passos, C., Coimbra, M., Silva, C. y Soares-da-Silva, P. (2013). Inhibitory effect of phenolic compounds from grape seeds (*Vitis vinifera* L.) on the activity of angiotensin I converting enzyme. *LWT-Food Science and Technology*, 54, 266-270.
- Al Shukor, N., Van Camp, J., Gonzales, G., Staljanssens, D., Struijs, K., Zotti, M. . . . Smagghe, G. (2013). Angiotensin-Converting Enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A Study of Structure Activity Relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), A-H.
- Alashi, A., Blanchard, C., Mailer, R., Agboola, S., Mawson, A., He, R. . . . Aluko, R. (2014). Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 55, 281-287.
- Aluko, R. (2012). *Functional Foods and Nutraceuticals*. Food Science Text Series. Canada: Springer Science+Business Media.
- Álvarez, M. (2009). Inhibidores de la enzima convertidora y antagonistas de los receptores de angiotensina II en la insuficiencia cardíaca crónica. *Insuficiencia Cardíaca*, 4(4), 152-156.
- Amato, M., Caruso, M., Guzzo, F., Galgano, F., Commisso, M., Bochicchio, R. y Favati, F. (2015). Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. *European Food Research and Technology*, 241, 615-625.
- Arellano, M. (2009). *Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café*. (Tesis de especialización). Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Distrito Federal, México.

- Arenas, R., Pachón, E., Méndez, G. y Guzmán, A. (2009). Estudio del efecto inhibitorio de extractos de *Salvia scutellarioides* sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina. *Revista Javeriana*, 14(2-3), 141-150.
- Atlas, S. (2007). The renin-angiotensin-aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8), S9-S20.
- Ayerza, R. (1996). Fatty acid composition, protein and oil content of chia (*Salvia hispanica* L.) grown in Colombia and Argentina. *Third European Symposium on Industrial Crops and Products*. Reims, France.
- Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(7), 495-500.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 321-324.
- Balasuriya, N. y Rupasinghe, H. (2012). Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chemistry*, 135, 2320-2325.
- Barbosa, J., Martins, V., Rabelo, L., Moura, M., Silva, M., Cunha, E. . . . Medeiros, I. (2006). Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(3), 421-446.
- Bhullar, K., Lassalle-Claux, G., Touaibia, M., y Rupasinghe, H. (2014). Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 730, 125–132.
- Bohm, B. (1998). *Introduction to flavonoids*. Australia: Hardwood Academic.
- Bonow, R., Mann, D., Zipes, D y Libby, P. (2014). *Braunwald's Heart Disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 10a. edición. Estados Unidos de América: Elsevier.
- Brieskorn, C. y Biechele, W. (1971). Flavones from *Salvia officinalis*. Compounds of *Salvia officinalis*. *Archive der Pharmazie*, 304, 557–561.

- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M., Velić, D. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 195-199.
- Bushway, A., Belya, P. y Bushway, R. (1981). Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*, 46, 1349-1356.
- Cahill, J. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4), 604-618.
- Castaño, R., Medina, M; De la Rosa, R. y Loria, J. (2011). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 49(3), 315-324.
- Coisin, M., Necula, R., Grigoras, V., Gille, E., Rosenhech, E. y Zamfirache. (2012). Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from Romanian flora. *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” din Iași (serie nouă), Secțiunea II a. Biologie vegetală*, 58(1), 35-44.
- Collado, J. (2011). *Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España.
- Da Silva, R., Aguiar, É., Alvez, S., Teixeira, A., Nogueira, M. y Maróstica, M. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.), 59, 1304-1310.
- De la Serna, F. (2010). *Insuficiencia Cardíaca Crónica*. 3era. edición. Argentina: Editorial Federación Argentina de Cardiología.
- Deddish, P., Marcic, B., Jackman, H., Wang, H., Skidgel, R. y Erdős, E. (1998). N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme angiotensin-(1–7) and keto-ACE. *Hypertension*, 31, 912-917.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T. y Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction

- of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84-91.
- Drago, M., López, M. y Saíñz, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68.
- Duarte, J., Galindo, P. y Pérez, F. (2011). Efecto de los polifenoles de los alimentos sobre el riesgo vascular. *Nutrición Clínica en Medicina*, 5(3), 107-125.
- Elbl, G. y Wagner, H. (1990). A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorophore-labelled substrate, dansyltriglycine. *Planta Medica*, 57, 137-141.
- Endringer, D., Oliveira, O. y Braga, F. (2013). In vitro and in silico inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. *Chemical Papers*, 68(1), 37-45.
- Eriz, G., Sanhueza, V., Roeckel, M. y Fernández, K. (2011). Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinifera* L. cv. País. *Food Science and Technology International*, 44(4):860-865.
- Fernández, A., Muñoz, A., Cambillo, E., Ramos, F. y Alvarado, C. (2007). Efecto del consumo moderado de vino tinto sobre algunos factores de riesgo cardiovascular. *Acta Médica Peruana*, 24(3), 145-152.
- Forclaz, A., Maillard, M., Nussberger, J., Brunner, H. y Burnier, M. (2003). Angiotensin II receptor blockade: Is there truly a benefit of adding an ACE inhibitor? *Hypertension*, 41(1), 31-36.
- Fuchs, S., Xiao, H., Hubert, C., Michaud, A., Campbell, D., Adams, J. . . . Bernstein, K. (2008). Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage *in vivo*. *Hypertension*, 51, 267-274.
- Fuglsang, A., Rattray, F., Nilsson, D. y Nyborg, N. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 27-34.

- Generalic, I., Skroza, D., Surjak, J., Mozina, S., Ljubenkovic, I., Katalinic, A. . . . Katalinic, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 9, 441-457.
- Ghosh, D. y Scheepens. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 322-331.
- Gómez, E. y Salím, C. (2006). *Actividad antioxidante de extractos de residuos de poda de olivos -Olea europaea L. -cultivar Arbquina procedentes del Valle Central de Catamarca*. (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional de Catamarca, Catamarca, Argentina.
- Gómez, M., González, L., Bravo, L., Vaquero, M. y Bastida, S. (2011). Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 26(2), 289-292.
- González, V. (2012). *Efecto hipotensor e inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I de extractos de semillas de Salvia hispanica L. in vitro e in vivo*. (Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Nuevo León, México.
- Gorzalczany, S., Moscatelli, V. y Ferraro, G. (2013). *Artemisia copa* aqueous extract as vasorelaxant and hypotensive agent. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 56-61.
- Guarnizo, A. (2012). *Experimentos de química orgánica*. Colombia: Elizcom.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., y Muguerza, B. (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. *PLoS ONE*, 7(11), 1-11.
- Guo, J., Zhang, J., Wang, W., Liu, T. y Xin, Z. (2015). Isolation and identification of bound compounds from corn bran and their antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities. *European Food Research and Technology*, 241(1), 37-47.
- Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L. . . . Hernández-Ávila, M. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. Resultados Nacionales. México: Instituto Nacional de Salud Pública.

- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F., Rebey, I., Bourgou, S., Limam, F. y Marzouk, B. (2013). Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 806-817.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- Hodgson, J. y Croft, K. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 495-502.
- Hooper, N. y Turner, A. (1987). Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl dipeptidase A (Angiotensin Converting Enzyme) from pig brain: A re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochemical Journal*, 241(3), 625-633.
- Huang, W., Cai, Y. y Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20.
- Huerta, B. (2001). Factores de riesgo para la hipertensión arterial. *Archivos de Cardiología de México*, 71(1), S208-S210.
- Ixtaina, V. (2010). *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispánica L.) obtenido mediante distintos procesos*. (Tesis de doctorado) Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Buenos Aires, Argentina.
- James, P., Oparil, S., Carter, B., Cushman, W., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., . . . Ortiz, E. (2014). Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the eighth Joint National Committee (JNC 8). *Journal of American Medical Association*, 311(5), 507-520.
- Jiménez-Ferrer, E., Hernández-Badillo, F., González-Cortázar, M., Tortoriello, J. y Herrera-Ruiz, M. (2010). Antihypertensive activity of *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 340-346.
- Kaur, S. y Das, M. (2011). Functional Food: An overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861-875.

- Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E. y Ariyoshi, Y. (1989). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(8), 2107-2114.
- Krishna, S. y Renu, S. (2013). Isolation and identification of flavonoids from *Cyperus rotundus* Linn. *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(2), 109-113.
- Kumar, S. y Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.
- Kunstmann, S. y Kauffmann, R. (2005). Hipertensión arterial: factores predisponentes y su asociación con otros factores de riesgo. *Revista Médica-Clínica Las Condes*, 16(2), 71-74.
- Kwon, Y., Vatter, D. y Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107-118.
- Kyselova, Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(4), 173-183.
- Lacaille-Dubois, M., Franck, U. y Wagner, H. (2001). Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8(1), 47-52.
- Lapornik, B., Prosek, M. y Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Loizzo, M., Lecce, G., Boselli, E., Menichini, F., y Frega, N. (2011). Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes involved in diabetes, obesity and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 35(2), 381-399.
- López, A. y Ortega, A. (2014). *Caracterización de semilla de chía (Salvia hispanica L.): Cuantificación parcial de compuestos fenólicos y capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I in vitro*. (Tesis de licenciatura) Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Nuevo León, México.

- Lu, Y. y Foo, L. (2002). Polyphenolics of *Salvia* -a review. *Phytochemistry*, 59, 117-140.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M. . . . Zannad, F. (2013). Guía de práctica clínica de la ESH/ESC para el manejo de la hipertensión arterial (2013). *Hipertensión y riesgo vascular*, 30(3), 1-91.
- Manrique, C., Lastra, G., Gardner, M. y Sowers, J. (2009). The renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Medical Clinics of North America*, 93(3), 569-582.
- Martínez, O. (2013). *Síntesis de derivados tipo éster de ácido cafeico y estudio de su comportamiento electroquímico en medios apróticos*. (Tesis de licenciatura) Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Xalapa, Veracruz.
- Miura, K., Kikuzaki, H. y Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of chemical components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1845-1851.
- Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T. y Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 963-975.
- Mohd, N., Keong, S., Yong, W., Kee, B., Wei, S. y Guan, S. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. ID 171956, 1-9.
- Mota, J. (2012). *Determinación del efecto vasorelajador del extracto metanólico de Salvia hispanica* L. en anillos aislados de aorta en ratas. (Tesis de licenciatura) Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Monterrey, México.
- Mujica, M., Granito, M. y Soto, N. (2012). Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. *Bioagro*, 23(3), 163-174.
- Muñoz, L., Cobos, A., Díaz, O. y Aguilera, J. (2013). Chia seed (*Salvia hispanica*): An ancient grain and a new functional food. *Food Reviews International*, 29, 394-408.

- Muñoz, W., Chávez, W., Pabón, L., Rendón, M., Chaparro, M. y Otálvaro-Álvarez, A. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46, 38-46.
- Murphy, B. y Diez, R. (1975). The use of Sephadex LH-20 column chromatography to separate unconjugated steroids. *Journal of Steroid Biochemistry*, 6, 233-237.
- Natesh, R., Schwager, S., Sturrock, E. y Acharya, K. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 421(6922), 551-554.
- Ng, C., Koon, C., Cheung, D., Lam, M., Leung, P., Lau, C. y Fung, K. (2011). The anti-hypertensive effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Gegen (*Pueraria lobata*) formula in rats and its underlying mechanisms of vasorelaxation. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1366-1372.
- Nishibori, N., Sagara, T., Hioroi, T., Kishibuchi, R., Sawaguchi, M., Itoh, M. . . . Her, S. (2012). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) by aqueous extracts prepared from edible and non-edible parts of lotus root. *Phytopharmacology*, 3(2), 309-318.
- Oddo, E. y Arrizueta, E. (2011). Rol del sistema kallicreína kinina y su interrelación con sistemas vasoactivos durante la preñez. *Medicina Buenos Aires*, 71(5), 413-419.
- Oh, H., Kang, D., Kwon, J., Kwon, T., Lee, S., Lee, D. y Lee, H. (2004). Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 2035-2037.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E; Zamilpa, A; Herrera-Arellano, A; Tortoriello, J. y Álvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 7-10.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Enfermedades cardiovasculares. Nota descriptiva*. Recuperado el 4 de julio de 2016, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

- Orona-Tamayo, D., Valverde, M., Nieto-Rendón, B. y Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 236-242.
- Osakidetza-Servicio Vasco de Salud. (2015). Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial. *Información Farmacoterapéutica de la Comarca*, 23(5), 33-41.
- Pablo, S. (2011). *Separación y evaluación del efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de Eysenhardtia polystachya (ort.) Sarg.* (Tesis de Maestría). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Peluso, I. y Palmery, M. (2015). Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 71, 102-107.
- Pérez, F., Duarte, J., Jiménez, R., Santos, C. y Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61, 67-75.
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M. y Del Toro-Sánchez, C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15(3), 18-22.
- Plazonić, A., Bucar, F., Maleš, Z., Mornar, A., Nigović, B. y Kujundžić, N. (2009). Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 14, 2466-2490.
- Porras-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M., Sosa-Morales, M., Palou, E. y López-Malo, A. (2013). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 1-7.
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

- Ranilla, L., Kwon, Y., Genovese, M., Lajolo, F., y Shetty, K. (2010). Effect of thermal treatment on phenolic compounds and functionality linked to type 2 diabetes and hypertension management of peruvian and brazilian bean cultivars (*Phaseolus Vulgaris* L.) using *in vitro* methods. *Journal of Food Biochemistry*, 34(2), 329–355.
- Reyes-Caudillo, E; Tecante, A. y Valdivia-López, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656-663.
- Rosales, M. y González, R. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques*, 9(2), 41-49.
- Rosendorff, C., Lackland, D., Allison, M., Aronow, W., Black, H., Blumenthal, R., . . . White, W. (2015). Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: A scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(18), 1998-2038.
- Rufián-Henares, J. y Morales, F. (2007). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1480-1485.
- Sakaida, H., Nagao, K., Higa, K., Shirouchi, B., Inoue, N., Hidaka, F. . . . Yanagita, T. (2007). Effect of *Vaccinium ashei* reade leaves on angiotensin converting enzyme activity *in vitro* and on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats *in vivo*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2335-2337.
- Salazar-Vega, I., Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. (2012). *Antihypertensive and antioxidant effects of functional foods containing chia (Salvia hispanica) protein hydrolysates. Scientific, health and social aspects of the food industry*. Recuperado de: <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/scientific-health-and-social-aspects-of-the-food-industry/antihypertensive-and-antioxidant-effects-of-functional-foods-containing-chia-salvia-hispanica-protei>
- Santeliz, H., Romano, L., González, A. y Hernández H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, 19(1), 21-29.

- Sargi, S., Silva, B., Santos, H., Montanher, P., Boeing, J., Santos, O. . . . Visentainer, J. (2013). Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. *Food Science and Technology*, 33(3), 541-548.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. y Yoga, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1-10.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S-2085S.
- Schewe, T., Steffen, Y. y Sies, H. (2008). How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476, 102-106.
- Schieber, A. (2012). Functional Foods and Nutraceuticals. *Food Research International*, 46, 437.
- Secretaría de Salud de Nuevo León. (2012). *Encuesta Estatal de Salud y Nutrición - Nuevo León 2011/2012*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Facultad de Medicina, Sistema para el Desarrollo Integral para la Familia, Nuevo León, Cáritas de Monterrey, Secretaría de Educación de Nuevo León. Monterrey, N.L.
- Secretaría de Salud. (2012). Resumen integrado Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. *Revista Mexicana de Cardiología*, 23(1), 4A-38A.
- Secretaría de Salud. (2014). *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica*. (Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud, Ed.). Recuperado el 1 de diciembre de 2014, de Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y Tratamiento de la Hipertensión Arterial en el Primer Nivel de Atención Médica: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/076-GCP__HipertArterial1NA/HIPERTENSION_RR_CENETEC.pdf
- Segall, L., Covic, A., y Goldsmith, D. (2007). Direct renin inhibitors: The dawn of a new era, or just a variation on a theme? *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 22, 2435–2439.

- Sentandreu, M. y Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546-554.
- Shao, Y. y Bao, J. (2015). Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*, 180, 86-97.
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2015). Sigma-Aldrich. Recuperado el 22 de junio 2015, de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>
- Silva, C., García, V. y Zanette, C. (2016). *Salvia hispanica* L. oil extraction using different organic solvents: oil yield, fatty acids profile and technological analysis of defatted meal. *International Food Research Journal*, 23(3), 998-1004.
- Silveira, M. y Salas-Mellado, M. (2014). Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5), 263-269.
- Simaratanamongkol, A., Umehara, K., Noguchi, H., y Panichayupakaranant, P. (2014). Identification of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor from Thai edible plants. *Food Chemistry*, 165, 92-97.
- Taga, M., Miller, E., y Pratt, D. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 61(5), 928-931.
- Tavares, L., Oliveira, C., Tavares, L., Monteiro, A., da Cruz, A. y Silva, A. (2014). Chia flour supplementation reduces blood pressure in hypertensive subjects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 392-398.
- Te Riet, L., Van Esch, J., Roks, A., Van den Meiracker, A. y Jan Danser, A. (2015). Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circulation Research*, 116, 960-975.
- Tomás, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10(2), 41-53.
- Tortora, G. y Derrickson, B. (2014). *Principles of Anatomy and Physiology*. 14 ed. Nueva York: Wiley.

- Tsuda, Y. (2004). *Isolation of Natural Products*. Japan: Japan Analytical Industry Company, Ltd.
- Udenigwe, C., y Aluko, R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11–R24.
- Ulbricht, C., Chao, W., Nummy, K., Rusie, E., Tanguay-Colucci, S., Iannuzzi, C. . . . Weissner, W. (2009). Chia (*Salvia hispanica*): A systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 4, 168-174.
- Ullah, R., Nadeem, M., Khalique, A., Imram, M., Mehmood, S., Javid, A. y Hussain, J. (2016). Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1750-1758.
- Ulubelen, A., Miski, M., Neuman, P. y Mabry, T. (1979). Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *Journal of Natural Products*, 4(3), 261-263.
- Vargas, M. (2010). *ED50plus*. v1.0. México: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Programa computacional.
- Velickovic, D., Nikolova, M., Ivancheva, S., Stojanovic, J. y Veljkovic, V. (2007). Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(1), 73-80.
- Viñas, P. y Campillo, N. (2014). Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods, en Watson, R. (Ed.), *Polyphenols in plants: Isolation, purification and extract preparation* (103-157). Nueva York: Academic Press.
- Vuksan, V., Whitham, D., Sievenpiper, J., Jenkins, A., Rogovik, A., Bazinet, R. . . . Hanna, A. (2007). Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care*, 30(11), 2804-2810.
- Wanasundara, J., Ross, A., Amarowicz, R., Ambrose, S., Pegg, R. y Shand, P. (2002). Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated,

- hydrolyzed bovine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6981-6988.
- Wang L. y Weller, C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.
- Wang, Y., Ying, L., Sun, D., Zhang, S., Zhu, Y. y Xu, P. (2011). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from *Ampelopsis grossedentata* stems: process optimization and antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 856-6870.
- Weir, M. y Dzau, V. (1999). The renin-angiotensin-aldosterone system: A specific target for hypertension management. *American Journal of Hypertension*, 12(12), 205S-213S.
- Wing, L., Reid, C., Ryan, P., Beilin, L., Brown, M., Jennings, G. . . . West, M. (2003). A comparison of outcomes with angiotensin-converting enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly. *New England Journal of Medicine*, 348, 583-592.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223
- Wollgast, J. y Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.
- Wu, J., Aluko, R. y Muir, A. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950(1-2), 125-130.
- Yaniv, Z., Schafferman, D. y Zur, M. (1995). The effect of temperature on oil quality and yield parameters of high- and low-erucic acid *Cruciferae* seeds (rape and mustard). *Industrial Crops and Products*, 3, 247-251.
- Zapata, C. y Cardona, M. (2014). *Estudio de la biodisponibilidad de los antioxidantes hidrosolubles tipo flavonoides para su utilización en la industria de las bebidas*. (Tesis de especialidad) Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingenierías, Antioquía, Colombia.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ana Sofía Ortega Villarreal

Candidato para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Nutrición

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Salud Pública y Nutrición

Tesis: **IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA PRESENTE
EN EXTRACTOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.),
SOBRE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA**

Campo de estudio: Alimentos Funcionales

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 18 de octubre de 1991; hija de Hiram Ernesto Ortega Cota y Olga Villarreal Elizondo.

Formación académica: Licenciatura en Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2009 – 2014, tercer lugar de generación y mención honorífica por trayectoria académica sobresaliente, calidad en la investigación y examen profesional.

Experiencia profesional: Analista de Laboratorio de Alimentos, Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, Universidad Autónoma de Nuevo León (2013 – 2016). Participación en 8 congresos y eventos académicos a nivel nacional e internacional, producto de proyectos de investigación de pregrado y posgrado.